

NK 细胞在晚期结肠癌综合治疗中的应用研究

王聪洁¹ 杨丽丽² 李朝阳³ 黄常新^{1,3▲}

1.浙江中医药大学第四临床医学院,浙江杭州 310053;2.杭州师范大学医学院,浙江杭州 310036;

3.杭州师范大学附属医院肿瘤内科,浙江杭州 310015

[摘要] 目的 探讨自体 NK 细胞联合化疗、靶向治疗对晚期结肠癌患者的综合治疗疗效。方法 收集 2015 年 6 月~2017 年 10 月本院 IV 期结肠癌患者 37 例,治疗方案经患者知情同意,共分为两组,单克隆靶向药联合化疗药物和体外培养 NK 细胞(A 组)17 例,化疗联合单克隆靶向药物治疗 20 例(B 组),均经病理证实为结肠腺癌。统计患者治疗疗效,分析治疗前后 PS 评分、粒/淋(Neutrophil to Lymphocyte Ratio, NLR)比值、NK 细胞水平改变,观察不良反应发生率,两组患者经过 3~12 个月的随访,参照实体瘤评价标准 1.1 版评估患者疾病控制率(Disease control rates, DCR)、中位疾病进展时间(Time To Progress, TTP)。结果 A 组 NK 细胞数量及活性较 B 组明显上升,粒/淋比值水平显著下降($P=0.002$);A 组控制率(DCR)较 B 组改善明显($P=0.018$);功能状态评分(PS 评分)两组均有改善,A 组较 B 组改善明显($P=0.024$),疾病进展时间(TTP)显著延长($P=0.003$);输注过程中不良反应发热不适组间无明显差异性,A 组 3、4 级骨髓抑制发生率较 B 组有显著改善($P=0.04$)。结论 化疗、单克隆靶向药物联合 NK 细胞治疗能够提高药物抗肿瘤杀伤性,改善结肠癌患者基础免疫状态,降低化疗及靶向药物毒副反应,一定程度上提高带瘤生存质量,延长生存期。

[关键词] NK 细胞;结肠癌;综合治疗;单克隆靶向药物

[中图分类号] R735.35

[文献标识码] B

[文章编号] 1673-9701(2019)14-0072-05

Application of NK cells in the comprehensive treatment of advanced colon cancer

WANG Congjie¹ YANG Lili² LI Zhaoyang³ HUANG Changxin^{1,3}

1.The Fourth Clinical Medical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2.School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 3.Department of Oncology, Affiliated

Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China

[Abstract] **Objective** To investigate the comprehensive treatment effect of autologous NK cells combined with chemotherapy and targeted therapy on patients with advanced colon cancer. **Methods** A total of 37 patients with stage IV colon cancer treated in our hospital from June 2015 to October 2017 were enrolled. The treatment plan was informed and consented by the patients. The patients were divided into two groups, including 17 cases of monoclonal antibody-targeted drugs combined with chemotherapy drugs and in vitro cultured NK cells(group A), and 20 cases of chemotherapy combined with monoclonal targeted drug therapy(group B), with all confirmed with colon adenocarcinoma by pathology. The therapeutic effects of the patients were analyzed. The PS score, the Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and the level of NK cells before and after treatment were analyzed. The incidence of adverse reactions was observed. The three groups were followed up for 3-12 months. The patient's disease control rate(DDR) and time to progress(TTP) were evaluated referring to solid tumor evaluation criteria version 1.1. **Results** The number and activity of NK cells in group A were significantly higher than those in group B, and the ratio of granules in group A was significantly decreased ($P=0.002$). In the aspect of therapeutic effect, the disease control rate (DCR) of group A was significantly improved compared with that of group B ($P=0.018$); functional status scores (PS scores) improved in both groups, and the scores of group A improved significantly compared with that of group B($P=0.024$), and disease progression time (TTP) was significantly prolonged($P=0.003$). There was no significant difference in adverse reactions during infusion between two groups. The incidence of grade 3, 4 myelosuppression was significantly improved in group A compared with that of group B ($P=0.04$). **Conclusion** Chemotherapy, monoclonal targeted drugs combined with NK cell therapy can improve the anti-tumor killing effect of drugs, improve the basic immune status of colon cancer patients, reduce the side effects of chemotherapy and targeted drugs, and improve the quality of life of tumors and prolong survival.

[Key words] NK cells; Colon cancer; Comprehensive treatment; Monoclonal targeted drugs

[基金项目] 吴阶平医学基金(320.6750.15236);浙江省重点科技专项项目(2017C03053)

▲通讯作者

近年来,中国结肠癌发病率呈上升趋势,严重威胁人类身体健康^[1]。目前结肠癌的治疗从过去单纯的手术、放疗、化疗,逐渐发展到单克隆靶向药物、免疫检查点抑制剂、过继细胞免疫治疗,以及几种模式联合治疗在内的多种治疗途径。特别是自 2013 年癌症免疫疗法被《Science》杂志评为最重要的医学科学突破,NK 细胞过继细胞免疫治疗处在快速发展阶段,被广泛用于肿瘤的治疗研究和开发利用。

NK 细胞作为免疫防御系统的第一道防线,通过表达 CD56、NKP46 等能在非主要组织相容性复合体(MHC)中裂解肿瘤细胞和病毒感染细胞,且无需预先致敏^[2],进而发挥免疫防御功能,解决实体肿瘤细胞缺少理想靶点这一问题。多项研究发现机体内 NK 细胞数量与患者生存期密切相关,而大部分肿瘤患者存在肿瘤的消耗和营养的下降,体内 NK 细胞数量明显减少^[3,4]。研究显示体外活化扩增的 NK 细胞具有更好的抗肿瘤治疗效果,提高肿瘤的杀伤率,且不会引起移植植物抗宿主反应(GVHD)^[5]。靶向药物发展日新月异,因其特异性高、副作用小,有着“个体化”治疗的美誉,受到临床医生的青睐和肿瘤患者的欢迎。NK 细胞免疫治疗是单克隆抗体通过 ADCC 活化介导特异性抗肿瘤的最主要的效应细胞,主要通过 NK 细胞表面表达 Fc γ 受体(CD16),能够识别肿瘤细胞表面的 IgG1 和 IgG3 单克隆抗体 Fc 段,介导 NK 细胞识别被抗体包被的靶细胞,启动抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用,进而杀伤靶细胞。目前 NK 细胞在国内外的临床研究应用分布较为广泛,然大多数是对于 NK 免疫活性或机制的基础研究,真正进行临床运用的极少,本研究具有较高的创新性和前瞻性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析 2015 年 6 月~2017 年 10 月本院 IV 期结肠癌患者治疗数据,共收集入组患者 37 例,分为两组,NK 细胞联合单克隆靶向药物、化疗(A 组)17 例;化疗联合靶向药物组(B 组)20 例。全部患者均按报批的卫计委三类新技术实施方案进行(患者均经充分知情同意),诊断分期根据美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network,NCCN)结肠癌指南(2017 年版)^[6],均经病理证实为结肠腺癌。A 组平均年龄(55.00 $\pm$ 6.26)岁,男 11 例,女 6 例,B 组平均年龄(59.34 $\pm$ 7.37)岁,男 12 例,女 8 例,两组在年龄、性别等一般资料上无统计学差异。统计患者治疗前后 PS 评分、粒/淋(Neutrophil to Lymphocyte Ratio,NLR)比值、NK 细胞水平改变,观察治疗中出现的发热不适反应及治疗后的骨髓抑制情况,两组患者经过 3~12 个月的随访,参照实体瘤评价标准 1.1 版^[7]评估患者有

效率(Response Rate,RR)、疾病控制率(Disease control rates,DCR)、中位疾病进展时间(Time To Progress TTP)。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准^[8,9]:(1)免疫组化证实肿瘤 EGFR 阳性或弱阳性的肿瘤患者,Kras 基因均为野生型^[10];(2)接受常规一线化疗后进展或复发;(3)各组年龄、性别、肿瘤分期相当进行入选;(4)经伦理委员会通过及患者充分知情同意,签署知情同意书。排除标准^[8,9]:(1)一般情况差、年老体弱、PS 大于 3 分,无法耐受者;(2)骨髓功能差、严重贫血和白细胞和血小板降低;(3)严重肝肾功能异常;心血管、肺功能障碍者;(4)做过大面积放疗、高龄、严重感染、肾上腺功能不全等;(5)缺乏适当的支持设施,不能充分合作的患者;(6)严重过敏体质者;自身免疫病患者;(7)正在使用免疫抑制剂或器官移植;(8)顽固的或持续癫痫患者;孕妇与哺乳期妇女;(9)多脏器功能衰竭期。

1.3 治疗方案

A 组 EGFR 单克隆抗体靶向药物“西妥昔单抗注射液”起始剂量 400 mg/m²,随后 1 周 250 mg/m²生理盐水稀释(按使用说明书)后静滴,续以静滴制备好的 NK 细胞,治疗前使用异丙嗪等辅助药;化疗方案为 FOLFOX6 方案:奥沙利铂+亚叶酸钙+5-氟尿嘧啶:5-氟尿嘧啶化疗周期第 1 天静滴(400 mg/m²),之后化疗泵持续静脉滴入(46 h);奥沙利铂:化疗周期第 1 天 100 mg/m²,3 h 内完成,亚叶酸钙:化疗周期第 1 天静脉滴注(400 mg/m²)。B 组在 EGFR 单克隆抗体靶向药物“西妥昔单抗注射液”给药后,按 FOLFOX6 方案进行化疗。注:(1)NK 细胞培养严格遵照“NK 细胞制备操作规程”和遵守“质量控制标准”;(2)根据患者体表面积,计算靶向药及化疗药物总使用剂量;(3)A 组 NK 细胞 D1-3 及靶向药物 D1-3(西妥昔单抗注射液 1 个疗程剂量分 3 次加入 NK 细胞悬液中)第 1 天开始输注,靶向药物同 NK 细胞分 3 d 静滴输入;(4)治疗前测量患者生命体征,使用异丙嗪减轻和预防过敏反应;(5)治疗过程中使用心电监护和血氧饱和度监测。

注:奥沙利铂:化学名(1R,2R)-(1,2 环己烷-二胺-N,N')[(乙二酸(2-)-O,O')络铂,生产厂家江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 50 mg H20000337,100 mg H20040817,规格 50 mg,100mg。5-氟尿嘧啶:化学名 5-氟-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮,生产厂家天津金耀药业有限公司,国药准字 H12020959,规格 0.25 g/10 mL。亚叶酸钙:化学名 N-[4-[(2-氨基-5-甲酰基-4-氧代-1,6,7,8-四氢-6-蝶啶基)甲基]氨基]苯甲酰基-L-谷氨酸钙盐,生产厂家江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 0.1 g H32022391,规格 0.1 g。西妥昔单抗注射液:生产厂家德国默克公司,注册证号 S2005 0095,规格 100 mg/50 mL。

1.4 NK 细胞的制备

1.4.1 实验材料 淋巴细胞分离液:比重 1.077。ksNK 试剂盒:试剂 A 液、工程细胞 A、工程细胞 B。ksNK 专用培养基(PNS-0300)。T25 培养瓶,T75 培养瓶,超净工作台,离心机,倒置显微镜,血细胞计数仪,CO₂ 培养箱,抗 CD16-PE 抗体,抗 CD56-PE 抗体,抗 CD3-FITC 抗体,生理盐水。

1.4.2 NK 细胞的分离、扩增和活化 准备工作:打开超净工作台的紫外灯,照射 30 min。细胞分离及培养:肝素抗凝的 60 mL 外周血作为生产标本准备。通过淋巴细胞分离液分离出单个核细胞(PBMC),预计获得(4~9)×10⁷ 个细胞即可。对单个核细胞进行洗涤、重悬,计数后每(3.5~4.5)×10⁷ 个细胞用 20 mL NK 专用培养基(含 IL-2 因子 100 U/mL)重悬并加入 1 支工程细胞 A,添加 1 mL 自体血清,转移至 1 个 75 cm² 培养瓶,当每份细胞体积达到 80~120 mL 时,加入 1 支工程细胞 B 并等体积补液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养(每人份宜接 1~2 个 75 cm² 培养瓶)。根据细胞悬液状态添加培养液,第 7~9 天再次刺激,培养液体积大于 200 mL 或细胞量大于 2×10⁸ 时,转移至培养袋培养,第 8~14 天补液:观察或计数,根据颜色变化或细胞浓度添加培养液,使得细胞浓度在(2~3)×10⁶ Cell/mL。第 15~17 天收集:细胞增殖达到对数期,收集细胞进行回输。细胞收集,每次收集细胞,按照细胞回输量,可将培养袋中的细胞转入 50 mL 离心管中。1200 rpm,离心 10 min,弃上清,加 150 mL 生理盐水,添加 2% 白蛋白,并用 1 支 50 mL 注射器转入 250 mL 转移袋中。用热合机封口,封 3 道,贴标签,备用。

1.4.3 NK 细胞鉴定 待细胞培养至一定数量时[(2~3)×10⁶/L],用 PBS 或 0.9%氯化钠重悬,调整细胞浓度至 1×10⁶/mL,用 FITC 标记的抗 CD3 抗体,PE 标记的抗 CD56、CD16 抗体在 4℃条件下孵育 30 min,生理盐水洗涤两次(5 min/次),重悬至 1 mL,立即用流式细胞仪检测,检测结果细胞 CD16⁺、CD56⁺水平。

1.5 PS 评分标准

评分标准^[1]:0 分:与起病前无任何差异,活动能力完全正常;1 分:能从事轻体力活动,可下地自由走动;2 分:能下地自由走动,做到生活自理,但已丧失工作能力,日间下地活动时间不小于 50%;3 分:生活仅能部分自理,日间卧床或坐轮椅时间超过 50%;4 分:卧床不起,生活不能自理;5 分:死亡。

1.6 疗效评价标准

入组患者治疗前 28 d 完善所有目标内评估,明确目标内病灶,排除隐性病灶,检测手段包括 PET-CT、增强 CT、X 线、B 超等。病灶直径测量采用增强 CT 评估。评估标准参照实体瘤 RICIST 1.1 版^[7]:(1)完全缓

解(CR):对于本研究评价要求完成所有目标病灶(包括术后病灶原位复发灶、肝转移病灶、肺转移病灶等)评价,所有目标病灶缩小至正常大小(短轴<1 cm);除结节性疾病外,所有目标病灶完全消失。(2)部分缓解(PR):所有可测量目标病灶的直径总和低于基线≥30%。目标结节总和和使用短径,其他目标病灶的总和和使用最长直径。(3)疾病进展(PD):所有测量的靶病灶直径之和的最小值为参照,直径和相对增加至少 20%(如果基线测量值最小就以基线值为参照);且所有直径和的绝对值增加至少 5 mm;出现一个或多个新发病灶即视为进展。(4)疾病稳定(SD):靶病灶减少或增大程度介于 PR 和 PD 之间,以直径之和的最小值作为参考。(5)排除不确定性因素。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计数资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(M)表示,用独立样本 *t* 检验和配对 *t* 检验;计数资料采用[n(%)]表示,用 Fisher 检验;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 分析,用 Log-rank 显著性检验;*P*<0.05 为差异具有统计学意义,*P*<0.01 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗前后粒/淋比值比较

A 组治疗前后粒/淋比值明显改善,有高度统计学意义(*P*<0.01);A 组较 B 组粒/淋比值水平显著下降,有高度统计学意义(*t*=3.7,*P*=0.002)(表 1)。

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	17	3.4±1.2	1.4±0.6	4.6	0.000
B 组	20	3.8±1.5	2.9±1.0	1.2	0.214

2.2 两组治疗前后患者体内 NK 细胞水平比较

A 组 NK 细胞数量得到明显提升,有高度统计学意义(*P*<0.01),B 组 NK 细胞数量无明显变化;A 组较 B 组 NK 细胞变化有高度统计学意义(*t*=10.2,*P*<0.01)(表 2)。

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
A 组	17	19.5±1.4	49.7±1.7	14.3	0.000
B 组	20	16.6±2.2	18.1±3.2	1.1	0.271

2.3 两组治疗前后 PS 评分比较

A 组、B 组患者功能状态评分均有不同程度改善,A 组较 B 组改善程度明显,有统计学意义(*t*=2.5,*P*=0.024)(表 3)。

表 4 两组疗效评价

组别	n	CR	PR	SD	PD	RR	DCR	TTP(月)
A 组	17	0	5	9	3	5(29.4)	14(82.4) [#]	7.3 [*]
B 组	20	0	3	5	12	3(15.0)	8(40.0)	4.8

注:与 B 组比较,[#]P=0.018<0.05,^{*}P=0.001<0.01

表 3 两组治疗前后 PS 评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	治疗前	治疗后	t 值	P 值
A 组	17	2.0±0.4	1.3±0.6	6.2	0.000
B 组	20	2.2±0.3	1.6±0.5	2.1	0.049

2.4 两组疗效评价

使用 RICIST 1.1 版实体瘤疗效评价标准,A 组治疗疗效较 B 组控制率(DCR)改善明显;两组经过 3~12 个月的随访时间,A 组中位 TTP 7.3 个月,B 组中位 TTP 4.8 个月,两组间疾病进展时间有高度统计学意义($\chi^2=8.884$, $P=0.003<0.01$),A 组疗效明显优于 B 组(表 4,封三图 3、4)。

2.5 不良反应

A 组治疗过程中发热不适较 B 组无明显差异性,骨髓抑制情况(白细胞、中性粒细胞、红细胞、血小板)3、4 级骨髓抑制率 A 组较 B 组有显著改善,有统计学意义($P=0.04$)(表 5)。

表 5 两组不良反应发生率比较[n(%)]

组别	n	发热不适率	3、4 骨髓抑制率
A 组	17	3(17.6)	3(17.6) [#]
B 组	20	2(10.0)	11(55.0)

注:与 B 组比较,[#]P=0.04<0.05

3 讨论

结肠癌早期即可发生转移,80%~90%面临不可切除的肝转移和严峻的预后,5 年生存率低于 12%。NK 细胞数目及 CD16⁺、CD56⁺的高低对肿瘤的发生、发展过程有一定的警示作用,长期低水平 NK 细胞人群的肿瘤发生率明显升高,NK 细胞杀伤活性会明显下降;而 NK 细胞水平的升高提示良好的预后^[12]。

有研究^[13]报道 10 例急性粒细胞白血病儿童(0.2~21 岁)输注外源性 NK 细胞,同时联合环磷酰胺和氟达拉滨的治疗,输注后进行 6 次 IL-2(100 万 U/m²)的催化,体内 NK 细胞数量明显上升,约 14 d 达到高峰。患者显示了较好的安全性和适应性,症状较同类化疗改善明显。Miller 等^[8]进行 30 例患者的临床试验,包括 10 例转移性黑色素瘤,1 例霍奇金淋巴瘤和 19 例急性粒细胞白血病,在进行环磷酰胺和氟达拉滨化疗后,分组分别输 1×10⁵,1×10⁶,1×10⁷ 和 2×10⁷ cell/kg,维持 2 周时间的 IL-2 1.75×10⁶ IU/m² 促进 NK 细胞的增殖和活性,除个别患者近期出现了恶心、呕吐、失眠等症状,总体不良反应较轻,患者抗肿瘤免疫力较前

明显提高。国内杨孟寅等^[14]报道 1 例脑胶质瘤的患者接受共 5 次人血回输 NK 细胞(1.5~1.9×10⁹ 个)的临床治疗,随访 26 个月,患者影像学表现为 CR,显示了较好的临床效果;顾霞^[9]团队进行了 20 例Ⅲ~Ⅳ期晚期非小细胞肺癌 NK 细胞输注的临床研究,患者功能状态评分及基础免疫功能得到显著改善。目前国内外实验室研究报道较多,NK 细胞临床应用研究处在起步阶段,对于结肠癌等实体肿瘤临床应用较少,本研究具有较高的前瞻性。

本研究共纳入 37 例Ⅳ期结肠癌患者,分析 NK 细胞联合化疗、靶向治疗 17 例(A 组)、化疗联合靶向治疗 20 例(B 组)两种模式下治疗疗效,观察发现 A 组经 NK 细胞输注后,NLR 明显降低,较 B 组明显改善($P<0.01$)。研究表明化疗前后 NLR 水平高低可以作为消化道肿瘤潜在预后指标,高 NLR 往往预后不佳,与肿瘤进展密切相关^[15]。治疗前后比值的变化在一定程度上反映患者体内的炎症活动程度,对于病情的进展和预后具有重要影响^[16],这一指标亦被作为 PD1/PDL1 免疫治疗疗效的评价标准^[17]。

本研究发现经过 NK 细胞输注后,A 组患者 NK 细胞数量得到明显提高,NK 细胞联合治疗模式下患者功能状态评分(PS)存在明显改善,A 组 PS 评分较 B 组改善有统计学意义($P<0.05$)。一方面药物对肿瘤细胞的遏制和杀伤作用,同时合并有 NK 细胞的联合杀伤效应;另一方面 NK 细胞带来基础免疫功能的提高。研究发现传统的化疗药物引起细胞凋亡,诱发 DNA 损伤和癌细胞死亡的同时,化疗也能诱导肿瘤细胞对免疫效应器的增敏起重要作用,可以调节 NK 细胞活化或抑制配体在癌细胞上的表达,从而影响 NK 细胞对其的识别和清除^[18,19];西妥昔单抗靶向药物一方面通过参与级联信号通路介导肿瘤生长耐药、转移、血管生成和凋亡,一方面能够刺激 NK 细胞产生细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2),增强杀伤活性,同时可以促进 NK 细胞与肿瘤细胞接触,直接杀伤肿瘤细胞^[20];体外研究也证实 NK 细胞联合西妥昔单抗能够显著增加 NK 细胞杀伤活性^[21]。

在结肠癌患者临床疗效方面,A 组 DCR 控制率显著提高,疾病进展时间(TTP)得到改善,组间中位进展时间有统计学意义($P<0.01$),生存函数曲线图发现 A 组明显优于 B 组,联合治疗模式获益更大。安全性方面,发热不适组间没有显著差异,3~4 级骨髓抑制风险方面 A 组较 B 组有显著降低($P<0.05$),很大程度

上改善化疗的副反应,证实 NK 细胞联合治疗的综合模式下带来了显著的生存获益,与前面的研究发现具有一致性^[7,13,14]。

不足之处和难点:①NK 细胞体外分离和培养存在困难,成本较高,分离纯度受到影响;②NK 细胞培养周期长,影响因素大,化疗周期受到 NK 细胞培养时间限制,治疗存在延迟性;③NK 细胞在体内生存时间较短,维持周期短,需要定期连续的输注,患者定期采血分离培养,依从性较差;④NK 细胞治疗过程中进入实体瘤困难,往往在血液循环过程中被消耗,肿瘤微环境中细胞数量受到影响。

下一步方向:①寻找可替代的 NK 细胞系,解决 NK 细胞培养困难、周期长等问题,研究发现 NK92、NKL、NKG、KHYG-1 细胞系有较强的抗肿瘤活性,适用于 NK 细胞所介导的肿瘤免疫治疗,目前 NK92 是唯一进入临床试验段的细胞系^[22];②研制能够稳定表达相关因子的 NK 细胞系,使 NK 细胞能够自分泌或旁分泌细胞因子(如 IL-2、IL-12 等)作用于 NK 细胞自身,使其持续扩增和活化^[23]。

展望:近年来,嵌合型抗原受体的 NK 细胞(CarNK 细胞)的研发^[24-26]快速发展,弥补了 NK92 细胞缺乏 CD16 表面抗原不能启动 ADCC 效应的应用,拓宽 NK 细胞的替代治疗,促进 NK92 细胞株联合单克隆靶向药物的临床运用。2018 年 6 月中科大生命科学与医学部肖卫华教授团队启动 NK 细胞制剂治疗多线治疗失败恶性肿瘤的临床研究;2018 年 10 月美国将 NK 细胞纳入癌症免疫治疗试验,进一步推动了 NK 细胞的发展,NK 细胞过继细胞免疫治疗在未来有望与 PD1/PDL1 等免疫治疗比肩。

综上所述,NK 细胞联合化疗、靶向治疗模式能够明显改善晚期结肠癌患者生存质量,延缓肿瘤进展,延长生存期,带来生存质量的获益,其安全性值得肯定,一定程度上缓解了化疗带来的副作用。本研究为今后生物综合治疗模式提供了指导性经验和新的研究方向。NK 细胞免疫治疗仍具有众多的开发空间,需要深入研究。

[参考文献]

- [1] 郭天安,谢丽,赵江,等. 中国结直肠癌 1988-2009 年发病率和死亡率趋势分析[J]. 中华胃肠外科杂志,2018,21(1):33-40.
- [2] Fehniger TA,Cai SF,CAO X,et al. Acquisition of Murine NK Cell Cytotoxicity Requires the Translation of a Pre-existing Pool of Granzyme B and Perforin mRNAs[J]. Immunity,2007,26(6):798-811.
- [3] Wei X,Zhang C,Zang F,et al. The correlation of periph-

eral blood lymphocyte subsets with prognosis in lung cancer patients[J]. Chin Clin Oncol,2014,41(6):390-393.

- [4] 李月雅,张翠翠,魏熙胤,等. 肺癌患者外周血 T-淋巴细胞亚群 NK 细胞的基线数值及其与预后的关系[J]. 中国肿瘤临床,2016,43(5):204-210.
- [5] Ishikawa E,Tsuboi K,Saijo K,et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma[J]. Anticancer Res,2004,24(3b):1861-1871.
- [6] 邵仟仟,林国乐. 2017. V1 版《NCCN 结直肠癌诊治指南》更新解读[J]. 中国全科医学,2017,20(6):635-638.
- [7] 杨学宁,吴一龙. 实体瘤治疗疗效评价标准—RECIST[J]. 循证医学,2004,4(2):85-90.
- [8] Miller JS,Soignier Y,Panoskatsis-Mortari A,et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer[J]. Blood,2005,105(8):3051-3057.
- [9] 顾霞,王凯玲,芮庄华,等. 自体 NK 细胞过继输注对 III-IV 期 NSCLC 患者天然免疫与体力状态的影响[J]. 同济大学学报(医学版),2016,37(4):70-82.
- [10] Lièvre A,Bachet JB,Le Corre D,et al. KRAS mutations status is predictive of response to Cetuximab therapy in colorectal cancer[J]. Cancer Res,2006,66(8):3992-3995.
- [11] 张彤,马晓,张蕊. 替吉奥治疗老年或功能状态评分差晚期结直肠癌患者的疗效观察[J]. 中国全科医学,2013,16(3):305-307.
- [12] 郭亚荣,贾军梅,李清. 外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞比例在转移性结肠癌患者预后评估中的临床意义[J]. 基层医学论坛,2017,21(23):3099-3101.
- [13] Barkholt L,Alici E,Conrad R,et al. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients;a phase I clinical study[J]. Immunotherapy,2009,1(5):753-764.
- [14] 杨孟寅,亓云龙,曾振武,等. NK 细胞转输治疗恶性复发性脑胶质细胞瘤分析[J]. 国际免疫学杂志,2010,33(1):76-78.
- [15] 史敬东,钟志强,李有国,等. 胃癌初治患者术前外周血中性粒细胞和淋巴细胞比值与临床病理特征的关系及术后预后价值分析[J]. 癌症进展,2017(8):960-966.
- [16] Ozyurek BA,Ozdemirel TS,Ozden SB,et al. Prognostic Value of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR)in Lung Cancer Cases[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp,2017,18(5):1417-1421.
- [17] Suh KJ,Kim SH,Kim YJ,et al. Post-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio at week 6 is prognostic in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with anti-PD-1 antibody[J]. Cancer Immunology, Immunotherapy,2017(3):459-470.

(下转第 80 页)

- [9] Ercan I, Hafizoglu S, Ozkaya G, et al. Examining cut-off values for the state-trait anxiety inventory[J]. *Revista Argentina De Clinica Psicologica*, 2015, 24(2):143-148.
- [10] Yu-Chi Liu, Mark Wilkins, Terry Kim, et al. Cataracts[J]. *Lancet*, 2017, 39(5):600-612.
- [11] 马伊. 白内障超声乳化吸除并人工晶体植入[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:6-7.
- [12] Galloway NR. Common eye diseases and their management[M]. Springer International Publishing, 2016:97-98.
- [13] 惠娜, 喻磊, 王从毅, 等. 同轴 1.8mm 微切口白内障超声乳化吸除术的临床研究[J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16(10):1828-1831.
- [14] A Rozegnalmadej, Zarnowski, Tomasz. Cataract surgery today and 20 years ago[J]. *Polish Journal of Public Health*, 2015, 125(1):9-13.
- [15] Day Alexander, Burr Jennifer, Bunce Catey, et al. Single-masked non-inferiority trial of femtosecond laser-assisted versus manual phacoemulsification cataract surgery for adults with visually significant cataract: The FACT trial protocol[J]. *Bmj Open*, 2015, 5(11):e010381.
- [16] Guerrier G, Rondet S, hALLAL D, et al. Risk factors for intraoperative hypertension in patients undergoing cataract surgery under topical anaesthesia[J]. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 2016, 35(5):343-346.
- [17] Saumya S, Kanchan Kumar M, Sukalyan Saha R, et al. Comparison of preoperative nepafenac(0.1%) and flurbiprofen(0.03%) eye drops in maintaining mydriasis during small incision cataract surgery in patients with senile cataract: A randomized, double-blind study[J]. *Indian Journal of Pharmacology*, 2015, 47(5):491-495.
- [18] Tefvik, Reyhan, Zafer Onaran, et al. 0.1% Nepafenac reduces pain and increases patient comfort during cataract surgery[J]. *Contact Lens and Anterior Eye*, 2018, 25(5):1-4.
- [19] Antonio B, Francesco C, Giggio Lofoco. Pain during second eye cataract surgery under topical anesthesia: An individual study[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(10):1511-1514.
- [20] Piper BJ, DeKeuster RM, Beals ML, et al. Substitution of medical cannabis for pharmaceutical agents for pain, anxiety and sleep[J]. *Journal of Psychopharmacology*, 2017, 31(5):569-575.
- [21] BF Hudson, Ogden J, Whiteley MS. Randomized controlled trial to compare the effect of simple distraction interventions on pain and anxiety experienced during conscious surgery[J]. *European Journal of Pain*, 2015, 19(10):1447-1455.
- [22] Esme H, Kesli R, Apiliogullari B, et al. Effects of flurbiprofen on CRP, TNF- α , IL-6, and postoperative pain of thoracotomy[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2011, 8(3):216-221.
- [23] Andras H, Peter L, Andrea F, et al. Is second eye phacoemulsification really more painful?[J]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2012, 124(15):516-519.
- [24] Mowatt, Youseff E, Langford M. Anaesthesia for phacoemulsification surgery: Is it as comfortable as we think?[J]. *J Perioper Pract*, 2010, 20(1):30-33.

(收稿日期:2018-09-26)

(上接第 76 页)

- [18] Hogg SJ, Vervoort SJ, Deswal S, et al. BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(9):2162-2174.
- [19] Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: Two different ways for lenalidomide to block myeloma progression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):24031-24044.
- [20] 梅家转, 刘桂举, 张晓娟, 等. 吉非替尼上调 NKG2D 配体表达增强 A549 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(4):358-361.
- [21] 黄建栋, 杨建伟, 陈蓉明, 等. NK 细胞联合西妥昔单抗对大肠癌细胞 ADCC 作用的研究[J]. *福建医科大学学报*, 2012, 46(1):20-23.
- [22] Yagita M, Huang CL, Umehara H, et al. A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation[J]. *Leukemia*, 2000, 14(5):922-930.
- [23] Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24(1):287-320.
- [24] Boissel L, Betancur-Boissel M, Lu W, et al. Retargeting NK-92 cells by means of CD19 and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity[J]. *OncoImmunology*, 2013, 2(10):e265271-e265278.
- [25] Qing Zhang, Haixu Zhang, Jiage Ding, et al. Combination Therapy with EpCAM-CAR-NK-92 Cells and Regorafenib against Human Colorectal Cancer Models[J]. *J Immunol Res*, 2018.
- [26] 张莹, 沈玉静, 赵丽丽. 西妥昔单抗联合 FOLFRFI 关键治疗方案治疗晚期结肠癌效果分析[J]. *当代医学*, 2018, (18):116-118.

(收稿日期:2019-03-15)

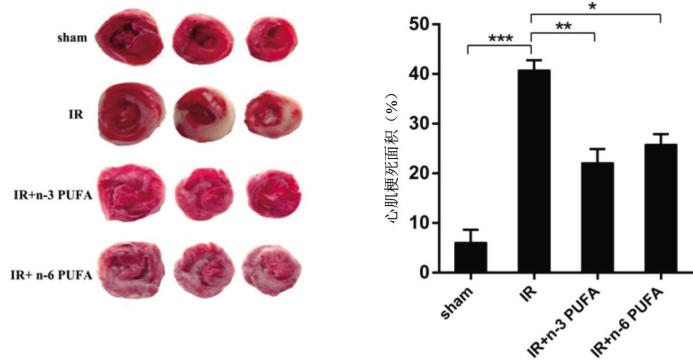


图 1 不同处理组大鼠心肌梗死面积
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)
(见内文第 33 页)

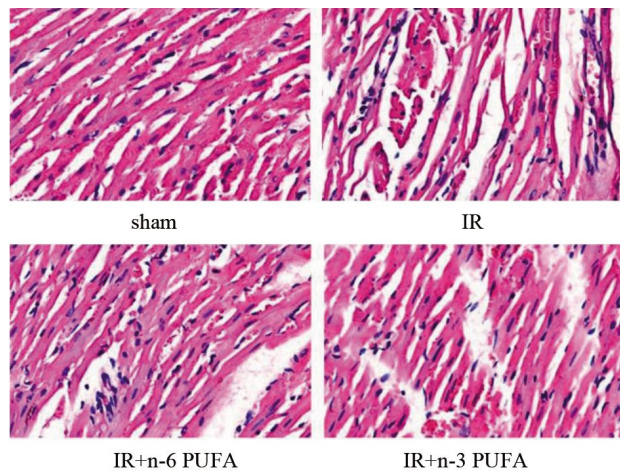


图 2 组织病理学检测大鼠心脏组织的变化(HE×400)
(见内文第 34 页)

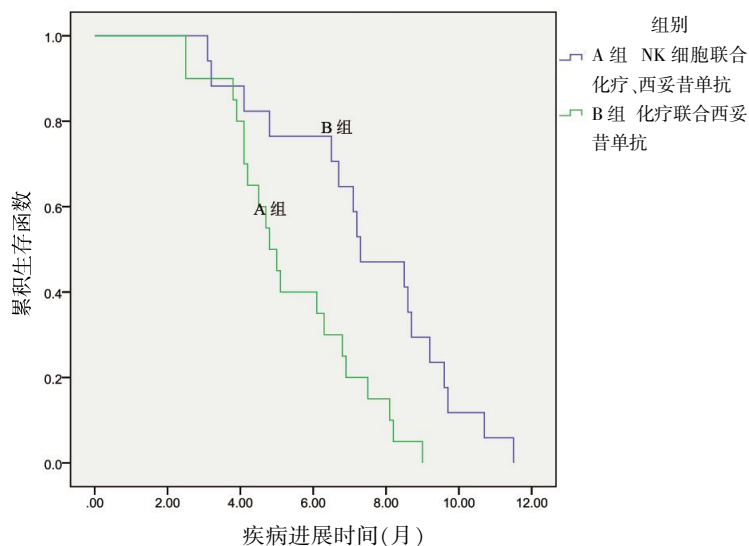


图 3 中位 TTP 生存函数图(见内文第 75 页)

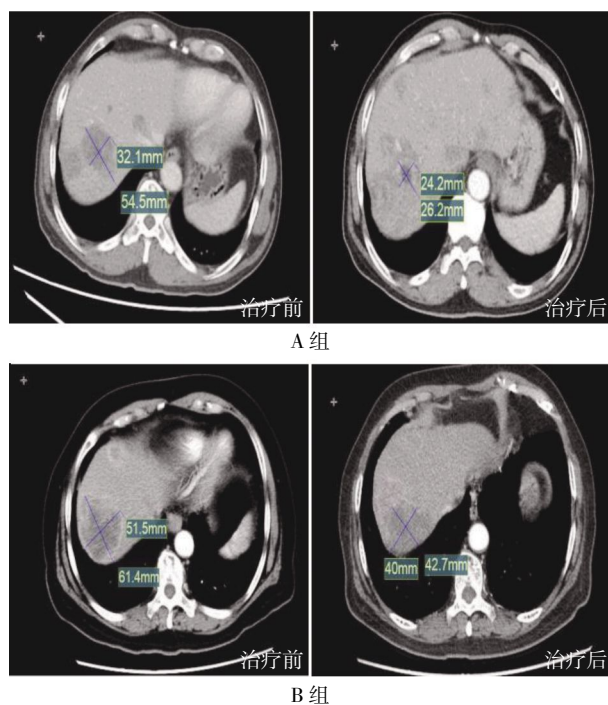
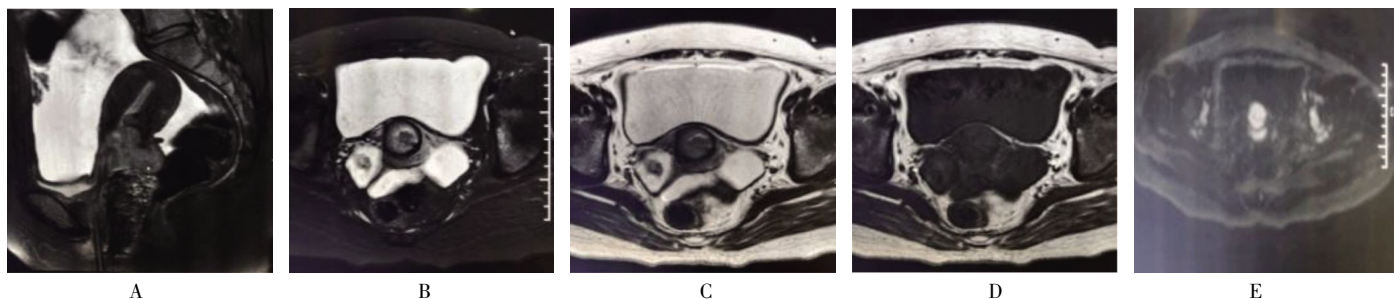


图 4 两组治疗前后结肠癌肝转移影像改变(PR)(见内文第 75 页)



A、B: 宫腔后壁见团状软组织信号, SPAIR 呈稍高信号影, 形态不规则, 边界不清晰, 病变累及阴道上部 1/3, 与后方直肠间隙存在。C: T2WI 序列呈稍高信号影。D: T1WI 序列呈低信号影。E: DWI 弥散呈明显高信号, 盆壁不规则增厚, 局部见结节, 提示盆壁转移

图 5 患者 MR 检查表现(见内文第 106 页)