

进展期胃癌术后 CIK 细胞联合化疗的临床疗效评价

要跟东, 霍红旗, 李 鹏*, 刘爱民, 王海东, 张 灿

(河北省邯郸市中心医院 核医学科, 河北 邯郸 056001)

摘要:目的 评价 CIK 细胞联合化疗用于进展期胃癌术后治疗的临床疗效及安全性。方法 选择进展期胃癌患者 76 例, 分为 CIK 细胞与化疗联合治疗组和单纯化疗组, 观察血培养和输注过程患者的临床情况以评价 CIK 细胞输注的安全性, 流式细胞分析检测体内 T 细胞亚群, 比较临床近期疗效, 用 Log-rank 检验比较两组无瘤生存期、总生存期。结果 自体 CIK 细胞治疗过程中个别病例主要出现低热、恶心、呕吐等症状, 未见明显毒不良反应; CIK 细胞输注后 $CD4^+/CD8^+$ 比值增高, NK 表达比率增高 ($P < 0.05$); 近期临床疗效, CIK 与化疗联合治疗组客观有效率和疾病控制率均高于单纯化疗组 (41.03% vs 18.92%, 61.54% vs 56.76%), ($P < 0.05$); 单纯化疗组术后中位无瘤生存期低于联合治疗组 ($P < 0.05$); 单纯化疗组术后总中位生存期为 36 个月, 联合治疗组为 39 个月。结论 CIK 细胞与化疗联合治疗是进展期胃癌术后的有效治疗手段, 可使机体免疫功能得到改善, 近期疗效明显, 并且可延长患者无瘤生存期。

关键词: 进展期胃癌; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 过继免疫疗法

中图分类号: R 735.7 文献标志码: A

Evaluation of the clinical efficacy of CIK cell combined with chemotherapy for advanced gastric cancer after operation

YAO Gen-dong, HUO Hong-qi, LI Peng*, LIU Ai-min, WANG Hai-dong, ZHANG Can

(Dept. of Nuclear Medicine, Central Hospital of Handan City, Handan 056001, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical efficacy and security of CIK cell combined with chemotherapy for advanced gastric cancer after operation. **Methods** 76 patients who suffered from advanced gastric cancer, were divided into CIK cell combined with chemotherapy treatment group and the chemotherapy group. Blood culture and infusion processes were observed for evaluating security of CIK cell infusion, T lymphocyte subsets *in vivo* were analysed with FCM, to compare its short-term clinical curative effect and their cancer-free survival time and overall survival time between the two groups with Log-rank inspection. **Results** In the process of autologous CIK cell treatment, some cases appeared the symptoms of slight fever, nausea, vomiting, not evident adverse reactions were seen. $CD4^+/CD8^+$ ratio increased after CIK cell infusion, NK expression increased ($P < 0.05$). In terms of short-term clinical curative effect, the objective effective ratio and the disease control ratio in combined treatment group and CIK were higher than those in the pure chemotherapy group (41.03% vs 18.92%, 61.54% vs 56.76%) ($P < 0.05$). The survival time of median cancer-free patients in chemotherapy group after operation was shorter than those of the union therapy group ($P < 0.05$). Patient's postoperation median survival time was 36 months in chemotherapy

group. Patients in combined treatment group was 39 months. **Conclusion** The technique of CIK cell combined with chemotherapy is effective, it can improve patient's immunity, make the patient's cancer-free survival time longer.

Key words: advanced gastric cancer; cytokine-induced killer cells (CIK); adoptive immunotherapy

目前,用于过继性免疫治疗的免疫活性细胞有淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)^[1]、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)^[2]、抗CD3单克隆抗体激活的杀伤细胞(CD3AK)^[3]等细胞,但这些细胞因存在制备困难、扩增倍速较低、杀瘤活性不高及毒不良反应大等诸多问题,限制了其在临床上的应用^[4]。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)因其具有T淋巴细胞强大的抗瘤活性和NK细胞的非MHC限制性杀瘤优点,常被认为是新一代肿瘤过继免疫治疗的首选方案,具有较好的应用前景^[5-7]。

在我国胃癌是一种最常见的恶性肿瘤之一,尽管采取了手术、化疗、放疗等各种治疗措施,患者预后仍然不佳。因此,亟待寻求综合抗肿瘤治疗的途径。目前对治疗进展期胃癌的报道较少,并且未对治疗效果特别是CIK细胞联合化疗综合治疗的安全性及疗效进行系统评价。本研究比较了单纯化疗、化疗联合CIK细胞过继免疫治疗的近期疗效和生存期,并评价CIK细胞免疫治疗的安全性及对免疫功能的影响,以期为临床广泛应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 CIK细胞制备

参考Chan JK等^[8]的方法,无菌抽取患者新鲜外周血40 mL,采用1.007 g/mL Ficoll 2 500 r/min 30 min密度离心分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。细胞经PBS洗涤加入RPMI-1640培养液(含10%人AB血清,100 U/mL青霉素,100 mg/mL链霉素,2 mmol/L L-谷氨酰胺和50 μ mol/L 2-巯基乙醇),于37℃、5% CO₂培养箱中培养。培养第0天加入人重组IFN- γ 1 000 U/mL,培养24 h后加鼠抗人CD3单抗25 ng/mL、人重组IL-2 300 U/mL,每2 d更换新鲜培养液,同时添加补充人重组IL-2,随着培养液体积增加将细胞转入3 000 mL细胞培养袋中继续培养,14 d收获CIK细胞备用。

1.2 病例选择

选择2006年1月~2010年7月在邯郸市中心医院行胃癌根治术的患者76例分组研究(男性44例,女性32例),术后病理根据国际抗癌联盟(UICC)分期标准证实均为进展期(IV期);患者中位年龄67(45~79)岁;预计生存期 ≥ 3 个月;心、肝、肺、肾等重要脏器功能正常;KPS评分 ≥ 60 分;术前未经放疗与任何方案化疗;患者自愿入组,并签署知情同意书。

1.3 治疗分组

将所有患者随机分为(1)单纯化疗组:采用TP方案(多西紫杉醇75 mg/m², d1; 顺铂25 mg/m², d1~4, 21 d/周期)化疗,共2周期,同时行常规抗过敏、止吐治疗;(2)联合治疗组:采用TP化疗和CIK细胞联合免疫治疗,在TP化疗结束后14 d,将制备好的CIK细胞溶于含5 $\times 10^5$ U IL-2、0.5%人血白蛋白的0.9% NaCl溶液中回输入患者体内。回输前,送检细菌和霉菌培养,并给予患者肌肉注射盐酸异丙嗪和地塞米松预防过敏。一般培养14 d左右回输细胞,每次回输CIK细胞数为(1.0~2.0) $\times 10^{10}$ 左右,间隔2周治疗/次,共回输治疗4次。两组中位年龄分别为58岁和62岁,男女构成比分别为1.42:1和1.35:1。

1.4 安全性评价

CIK细胞输注期间逐日观察及记录患者症状、体征的变化情况及不良反应,并隔期进行血细胞计数和血生化常规检验。不良反应依据NCI毒性评定标准进行评估^[9]。

1.5 免疫功能评价

收集患者CIK细胞第1次输注前及4次输注完成后外周肝素抗凝血,评价其免疫功能变化。应用美国BD公司生产的FACS Calibur流式细胞仪四色流式细胞术检测淋巴细胞亚群表达并计算其比值,检测方法参见产品说明。

1.6 近期疗效评价

按RECIST实体瘤的近期疗效标准^[10]分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)、疾病

进展(PD)4 级。治疗结束后 1 个月进行疗效评价。
客观有效率 (ORR) = (CR + PR)/总例数 × 100%
疾病控制率(DCR) = (CR + PR + SD)/总例数 × 100%

1.7 生存时间分析

从治疗开始至患者死亡或最后/次随访时间止,观察两组患者生存期。随访期间每月进行常规体检,无瘤生存以影像学检查发现复发病灶为事件终点。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件进行数据处理,两组间比较采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。CIK 细胞输注前后 T 亚群的数据比较应用配对样本的 Wilcoxon 符号秩检验;近期疗效比较采用卡方检验;Kaplan-Meier 法描述生存时间,并进行 Log-rank 检验,取双侧概率。

2 结果

2.1 安全性

回输后临床未观测到明显的不良反应,仅有 2 例患者出现发热症状,但体温在 37.8 ~ 38.5 ℃ 之间,持续 2 ~ 3 d 自行消退;1 例患者有恶心呕吐症状,1 例患者皮肤出现轻微皮疹,经对症处理均好转。回输后 2 个月内亦未见明显自身免疫性疾病的临床特征。血细胞计数及生化检验未见明显相关性异常(表 1)。

2.2 免疫功能

回输后 CD4⁺/CD8⁺ 比值和 NK 表达比率均显著高于回输前($P < 0.05$)(表 2)。

2.3 近期疗效评价

联合治疗组客观有效率及疾病控制率均高于单纯化疗组($P < 0.05$)(表 3)。

表 1 CIK 细胞治疗前后患者生化常规检测指标比较
Table 1 CIK cells before and after treatment in patients with biochemical conventional inspecting index comparison ($\bar{x} \pm s$)

| examination indexes | before | after |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| WBC(× 10 ⁹ /L) | 5. 8 ± 3. 2 | 6. 1 ± 2. 6 |
| RBC(× 10 ¹² /L) | 3. 5 ± 0. 6 | 3. 7 ± 0. 6 |
| Hb(g/L) | 115 ± 18 | 121 ± 18 |
| PLT(× 10 ⁹ /L) | 230 ± 61 | 255 ± 88 |
| ALT(U/L) | 28. 2 ± 25. 4 | 26. 8 ± 25. 0 |
| AST(U/L) | 24. 2 ± 14. 0 | 26. 6 ± 16. 3 |
| Cr(μmol/L) | 69. 7 ± 25. 6 | 71. 6 ± 22. 3 |

表 2 CIK 细胞输注前及 4 次回输后外周血 T 细胞亚群的变化
Table 2 CIK cell infusion before and after four doping peripheral T lymphocyte subsets of change(%)

| T lymphocyte subsets | doping before | doping after |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| CD3 ⁺ | 69. 8(33. 1 ~ 90. 1) | 70. 2(40. 1 ~ 92. 5) |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 30. 3(14. 2 ~ 50. 5) | 33. 4(18. 7 ~ 50. 4) |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 0. 9(0. 6 ~ 2. 2) | 1. 5(0. 8 ~ 2. 9) * |
| CD16 ⁺ | 2. 0(0. 3 ~ 6. 9) | 2. 0(0. 1 ~ 5. 6) |
| CD56 ⁺ | 7. 3(3. 1 ~ 20. 3) | 13. 6(2. 4 ~ 32. 8) * |

* $P < 0.05$ compared with before.

2.4 生存时间分析

两组患者治疗后全部随访,至 2010 年 5 月随访 6 ~ 52 个月,中位随访 38 个月。

术后无瘤生存期比较:单纯化疗组术后无瘤生存期(DFS)为 6 ~ 50 月,中位无瘤生存期为 27 个月(95% CI:20. 9 ~ 30. 0 月);化疗联合 CIK 治疗组术

表 3 单纯化疗组与 CIK 细胞联合化疗组的近期疗效评价
Table 3 Pure chemotherapy group and CIK cells combination chemotherapy group of short-term curative effect evaluation(%)

| group | complete catabatic | part catabatic | stable | progress | objective efficient(%) | disease control rates(%) |
|------------------|--------------------|----------------|--------|----------|--------------------------|----------------------------|
| chemotherapy | 0 | 7 | 14 | 16 | 18. 92 | 56. 76 |
| CIK + chemothery | 0 | 16 | 8 | 15 | 41. 03 * | 61. 54 * |

* $P < 0.05$ compared with chemotherapy group.

后无瘤生存期为 8 ~ 52 个月,中位无瘤生存期为 32 个月(95% CI:28.2 ~ 35.8 月)。单纯化疗组显著低于化疗联合 CIK 组($P < 0.05$)。

单纯化疗组术后总生存期(OS)为 10 ~ 52 月,中位生存期为 36 个月(95% CI:28.8 ~ 43.2 月);化疗联合 CIK 治疗组患者术后总生存期为 13 ~ 52 个月,中位生存期为 39 个月(95% CI:37.2 ~ 40.8 月)。两组比较无明显差别。

3 讨论

CIK 细胞是由人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子(如抗 CD3McAb、IL-2、IFN- γ 及 IL-1 α 等)诱导下制备的一群异质性细胞。CIK 细胞的杀伤活性与 CIK 细胞中 CD3⁺CD56⁺ 细胞和 NKG2D 的表达相关^[11-12],CIK 细胞不仅在表型上兼具 NK 细胞和 T 细胞的表型特征,而且在功能上兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性(非 T 细胞受体限制性)和 NK 细胞的非主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性杀瘤优点^[13]。另外,因为 CIK 细胞具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广、对多重耐药肿瘤细胞同样敏感、对正常骨髓造血前体细胞细胞毒性小等特点,并且 CIK 细胞的有效成分和生物活性不会受肿瘤患者的病情轻重、转移与否的影响,因此,CIK 细胞免疫治疗作为临床上抗肿瘤治疗的新生力量,越来越受到重视。

本实验以我院治疗的进展期胃癌患者为研究对象,在整个临床观察期间,除有少数患者出现低热、恶心、呕吐的症状外,均未出现其他毒不良反应,表明 CIK 细胞联合化疗的治疗方案是比较安全的。外周血 T 细胞亚群检测是反映机体细胞免疫状态的重要依据,NK 细胞是免疫监视细胞,除免疫调节

作用外,还可直接杀伤血液循环中的肿瘤细胞,防止肿瘤的远处转移。分析 CIK 细胞输注前后 T 细胞亚群变化水平发现,在完成整个 CIK 细胞回输治疗周期后 CD4⁺/CD8⁺ 比值增高,NK 表达比率增高,并且输注后均显著高于输注前,这与文献[14]的报道一致,提示 CIK 细胞输注可提高体内细胞免疫水平,有利于机体肿瘤细胞的清除及疾病的控制。但是由于本实验仅仅选择回输前及回输后 24 h 这 2 个时间点进行检测,并未进行多个时间点的连续检测比较,所以 CIK 细胞提高机体抗肿瘤免疫的作用,会持续多久、是否会有远期影响等均不确定。

在 CIK 细胞与化疗联合治疗组中,首先采用 TP 治疗方案,然后给予 4 次 CIK 细胞回输,结果 CIK 与化疗联合治疗组客观有效率及疾病控制率均高于单纯化疗组,而疾病控制率两组之间无差异,这与文献的研究报道相近^[15]。无瘤生存时间多用于肿瘤根治后辅助治疗的疗效评价,指治疗至肿瘤复发时间;而总生存时间既可以用以辅助治疗也可用以晚期或复发后的治疗评价。对两组患者的生存时间进行比较发现,单纯化疗组术后中位无瘤生存期低于联合治疗组,单纯化疗组术后总中位生存期略低于联合治疗组。

本实验结果表明,对于进展期胃癌术后行化疗和 CIK 细胞输注联合治疗是有效的治疗手段,CIK 细胞免疫治疗安全性好、毒不良反应少,治疗后使机体免疫学指标得到改善,近期疗效明显,并且无瘤生存期有显著延长,是一种值得在临床上推广的用于治疗进展期胃癌的有效辅助治疗模式。虽然在化疗基础上开展 CIK 细胞过继免疫治疗可有效延缓肿瘤复发,但是否会延长患者的总生存期还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Rosenberg SA. A doptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukine-2[J]. Important Adv Oncol,1986,32:55 - 91.
- [2] Rosenberg SA, Spiess PS, Lafreniere R. A new approach to adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Science,1986, 233:1318 - 1321.
- [3] Aderson PM, Blzar BR, BachFH, et al. Anti-CD3 + IL-2 stimulated murine killer cells[J]. Immunology,1989,142: 1383 - 1394.
- [4] 刘振华,王清水,林孟波,等. 肿瘤浸润淋巴细胞治疗胃癌的疗效[J]. 福建医科大学学报,1999, 33:386 - 389.
- [5] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expandedhuman

- CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency[J]. Immunology, 1994, 153: 1687 – 1696.
- [6] Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Human cytokine-induced killer cells have enhanced *in vitro* cytolytic activity via non-viral interleukin-2 gene transfer[J]. Genet Vaccines Ther, 2004, 2: 12.
- [7] 曹雪涛. 树突状细胞与肝癌的免疫治疗[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11: 133 – 134.
- [8] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, *et al.* Enhanced Killing of Primary Ovarian Cancer by Retargeting Autologous Cytokine-Induced Killer Cells with Bispecific Antibodies: A Preclinical Study[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 1859 – 1867.
- [9] 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册. 第五版[M]. 北京: 人民卫生出版, 2008, 142 – 145.
- [10] Duffaud F, Therasse P. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [J]. Bull Cancer, 2000, 87: 881 – 886.
- [11] Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, *et al.* Alloreactivity and an2ti2tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine2induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers[J]. Int Immunol, 2008, 20: 841 – 848.
- [12] Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, *et al.* Cytokine2induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T2EMRA lymphocytes [J]. Exp Hematol, 2009, 37: 616 – 628.
- [13] 蒋东霞, 徐虹, 胡杰英 等. 与 CIK 细胞共培养降低 K562/ADR 来源 DC 细胞 MDR-基因表达[J]. 基础医学与临床, 2008, 28: 194 – 195.
- [14] 张京雨, 张晓明. CIK 细胞过继性免疫治疗对结直肠癌化疗患者的免疫指标的影响[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22: 51 – 53.
- [15] 张燕, 刘继斌, 杨磊. 化疗联合 CIK 细胞治疗中晚期胃癌的临床疗效评价[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22: 346 – 348.

少看电视 常与家人吃晚饭可减少儿童肥胖症

据美国 WedMD 大众医疗新闻网(2010-02-08)报道, 刊载在 3 月《儿科学》(Pediatrics) 中的最新研究显示, 家中简单的生活习惯, 例如经常在家里吃饭, 可以减少学龄前儿童的肥胖。

研究结果显示, 学龄前儿童如果与家人一起吃晚餐、限制看电视的时间、并且有足够的睡眠的话, 可以减少近 40% 的肥胖风险。

研究主要发起人、俄亥俄州立大学流行病学副教授 Sarah Anderson 博士表示, 在以上 3 个做法中至少采取 1 个, 就可以降低这个年龄层的肥胖风险。

研究人员表示, 住在家里 4 岁儿童若遵守以上 3 种例行的生活方式, 肥胖概率会比没有遵守任何 1 种生活方式的儿童减少将近 40%, 这篇研究结果已考虑了母亲的肥胖和家庭收入等风险因子。

Anderson 博士和 Temple 大学公共卫生和儿科学教授 Robert Whitaker 博士在 2005 年分析美国共 8 550 位 4 岁小孩的数据, 其中 18% 的儿童被确认为肥胖。

他们发现:

做到这 3 种健康习惯的家庭, 肥胖罹患率只有 14.3%。

没有做到任何 1 种的家庭, 肥胖罹患率为 24.5%。

接触到家中有这 3 种健康习惯的孩子, 肥胖的概率比没有接触到的儿童少了 37%。

Anderson 博士表示, 即使是肥胖的高危险群, 这些做法也会有保护作用, 这很重要, 因为它显示出这些做法有可能对所有的小孩预防肥胖来说都是有用的。

研究人员表示, 3 个健康的做法是每周全家一起吃晚饭 5 次以上、每晚至少睡 10.5 h、以及平日看电视不超过 2 h。

研究人员表示, 即使只做到其中一种也可降低孩子变胖的风险, 每个做法可以降低 23% ~ 25% 的肥胖概率。

Anderson 博士表示, 每一种健康的做法似乎都与降低肥胖风险有关, 做得越多就越能降低风险。