

基础研究

胸腺肽  $\alpha 1$  对老年 CLL 患者 CIK 细胞体外扩增及杀瘤活性的影响蔡力力<sup>1</sup>, 杨波<sup>1</sup>, 迟小华<sup>2</sup>, 于睿莉<sup>1</sup>, 朱宏丽<sup>1</sup>, 卢学春<sup>1</sup>, 脱帅<sup>3</sup>, 脱朝伟<sup>3</sup>, 王瑶<sup>1</sup>, 韩为东<sup>1</sup>, 杨洋<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 冉海红<sup>1</sup>, 林洁<sup>1</sup>, 翟冰<sup>1</sup>, 范辉<sup>1</sup>, 李素霞<sup>1</sup><sup>1</sup>解放军总医院, 北京 100853; <sup>2</sup>解放军第二炮兵总医院药剂科, 北京 100800; <sup>3</sup>解放军第 202 医院医务处, 沈阳 110003

**摘要:** **目的** 探讨胸腺肽  $\alpha 1$  对老年 B 细胞性慢性淋巴细胞白血病 (B cell chronic lymphatic leukemia, B-CLL) 患者来源的细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine induced killer cells, CIK) 扩增及杀瘤活性的影响。 **方法** 以胸腺肽  $\alpha 1$  作为免疫增强方案, 1.6mg/d 皮下注射, 14d 为 1 周期。采集 4 例 B-CLL 老年患者外周血单核细胞, 每周 1 次, 分别在应用胸腺肽  $\alpha 1$  前和应用 1 周期后各采集 3 次, 在体外经干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、白介素-2 (IL-2) 及抗 CD3 单克隆抗体诱导成 CIK 细胞, 检测其扩增数量、效应细胞扩增倍数、淋巴细胞亚群比例及体外杀瘤活性。 **结果** 4 例在胸腺肽  $\alpha 1$  治疗前后各做 12 次 CIK 细胞培养, 培养时间 (13.8  $\pm$  1.4)d, 细胞存活率 95.46%  $\pm$  3.12%。培养后 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T 细胞比例均显著升高 (P<0.05), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例无显著变化 (P>0.05)。胸腺肽  $\alpha 1$  治疗后, CIK 细胞在扩增数量、效应细胞扩增倍数、比例及体外杀瘤活性明显高于治疗前 (P<0.05)。 **结论** 胸腺肽  $\alpha 1$  能够增强老年 B-CLL 患者 CIK 细胞体外扩增活性。

**关键词:** 细胞因子诱导的杀伤细胞; 胸腺肽; 慢性淋巴细胞白血病, B 细胞性; 老年人

中图分类号: R 733.7 文献标识码: A 文章编号: 1005-1139(2012)08-0869-04 DOI: 10.3969/j.issn.1005-1139.2012.08.028

网络出版时间: 2012-06-21 16:15 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20120621.1615.003.html

### Effect of thymulin $\alpha 1$ on in vitro amplification and tumoricidal activity of cytokine induced killer cells in elderly patients with chronic lymphatic leukemia

CAI Li-li<sup>1</sup>, YANG Bo<sup>1</sup>, CHI Xiao-hua<sup>2</sup>, YU Rui-li<sup>1</sup>, ZHU Hong-li<sup>1</sup>, LU Xue-chun<sup>1</sup>, TUO Shuai<sup>3</sup>, TUO Chao-wei<sup>3</sup>, WANG Yao<sup>1</sup>, HAN Wei-dong<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, RAN Hai-hong<sup>1</sup>, LIN Jie<sup>1</sup>, ZHAI Bing<sup>1</sup>, FAN Hui<sup>2</sup>, LI Su-xia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Department of Pharmacy, General Hospital of Chinese PLA Second Artillery Forces, Beijing 100800, China; <sup>3</sup>Division of Medical Administration, Chinese PLA 202 Hospital, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Corresponding Author: LU Xue-chun. Email: luxuechun@126.com; ZHU Hong-li. Email: bjzhl202\_cn@sina.com

**Abstract: Objective** To study the effect of thymulin  $\alpha 1$  on in vitro amplification and tumoricidal activity of cytokine-induced killer (CIK) cells in elderly patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). **Methods** Thymulin  $\alpha 1$ , an immunoenhancement agent, was subcutaneously injected at the dose of 1.6mg/d, for 14 days which served as a cycle. Peripheral monocytes, collected from 4 elderly B-CLL patients, once a week followed by 3 times a week before and after thymulin  $\alpha 1$  was used. CIK cells were induced into CIK cells with IFN- $\gamma$ , IL-2 and anti-CD3 monoclonal antibody. The number of amplified CIK cells and effectors, subgroups of lymphocytes and in vitro tumoricidal activity of CIK cells were detected. **Results** The CIK cells were cultured for 24 times before and after the patients were treated with thymulin  $\alpha 1$ . The average amplification time was (13.8  $\pm$  1.4)d and the cell survival rate was 95.46%  $\pm$  3.12%. The number of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells was significantly greater after culture than before culture (P<0.05). However, no significant difference was observed in the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells before and after culture (P>0.05). The number of amplified CIK cells and effectors, subgroups of lymphocytes and in vitro tumoricidal activity of CIK cells were significantly higher after thymosin  $\alpha 1$  treatment than before thymosin  $\alpha 1$  treatment (P<0.05). **Conclusion** Thymulin  $\alpha 1$  can increase the in vitro amplification and tumoricidal activity of CIK cells in elderly patient with B-CLL.

**Key words:** cytokine-induced killer cells; thymulin; chronic lymphocytic leukemia, B-cell lineage; aged

收稿日期: 2012-05-07 修回日期: 2012-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772597, 30873086, 81172986); 科技部新药创制重大专项 (2008ZXJ09001-019); 中国博士后科学基金 (20080431362); 中央保健研究基金 (B2009B115); 解放军总医院科技创新苗圃基金 (11KMM24)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30772597, 81172986, 30873086); National Science and Technology Major Projects for "Major New Drugs Innovation and Development" (2008ZXJ09001-019)

作者简介: 蔡力力, 女, 学士, 副主任技师。研究方向: 老年临床检验学及免疫学。Email: yangsongru312@163.com; 共同第一作者: 杨波 通信作者: 卢学春, 男, 博士, 主任医师, 副主任。Email: luxuechun@126.com; 朱宏丽, 女, 博士, 主任医师, 主任。Email: bjzhl202\_cn@sina.com

细胞因子诱导的杀伤 (cytokine induced killer, CIK) 细胞是一种新的抗肿瘤过继细胞免疫治疗方法, 且已在肝癌、肾癌、胃癌及肺癌等多种恶性实体瘤治疗中取得一定疗效。目前, 有关 CIK 细胞治疗老年肿瘤患者的报道还很少。我科前期采用自体 CIK 细胞联合免疫方案治疗老年淋巴瘤、骨髓增生异常综合征及骨髓瘤, 初步观察到胸腺肽治疗对 CIK 细胞体外诱导扩增及体内疗效具有促进作用<sup>[1-5]</sup>。为此, 本研究进一步探讨胸腺肽  $\alpha 1$  治疗对老年 B 细胞性慢性淋巴细胞白血病 (B cell chronic lymphatic leukemia, B-CLL) 患者来源的 CIK 细胞扩增及杀瘤活性的影响。

### 资料和方法

**1 临床资料** 解放军总医院老年血液科于 2008 年 8 月 -2010 年 12 月收治的 4 例老年 B-CLL 患者。B-CLL 诊断标准参照 2001 年新 WHO 造血淋巴组织肿瘤分类方法<sup>[6]</sup>, 分期采用 Rai 临床分期法, 疗效评价依美国 NCI 的 CLL 工作组标准<sup>[6-7]</sup>。本组 4 例男性, 年龄分别为 82、78、85 和 90 岁。1 例 II 期, 3 例 III 期, 均接受过多疗程化疗, 疾病部分缓解 (partial remission, PR) 和疾病稳定 (steady disease, SD)。见表 1。

**2 主要仪器和试剂** 所有试剂均为临床治疗级产品。无血清培养基 (Gibco 公司); rhIFN- $\gamma$  (20  $\mu$ g, 美国 Peprotech 公司); rhIL-2 (10  $\mu$ g, 美国 Peprotech 公司); anti-CD3 McAb (1.5ml, 美国 Pharmingen 公司); 胸腺肽  $\alpha 1$  (1.6mg/支, 意大利培森药业); 检测 T 细胞亚群和 B 细胞的各种抗体, 包括抗 CD3、CD4、CD5、CD8、CD56、CD19、CD20、FMC7、CD23、CD38、CD22、CD10、CD25、CD103、CD11c、sIgM、Lambda 轻链和 Kappa 轻链的单抗 (美国 BD 公司); 流式细胞分析仪 (美国 FACS-420 型), 用 Cellfit 软件进行数据处理。

**3 CIK 细胞制备** 本研究经解放军总医院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。参加 CIK 细

胞培养、质量控制的技术人员均经 GMP 培训和健康查体合格, 符合 GMP 上岗要求。患者晨起空腹采集外周静脉血 54ml, 分离单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 在符合本院基础所免疫室 GMP 的实验条件下, 用无血清培养基调整细胞浓度, 在每毫升细胞悬液中加入 rhIFN- $\gamma$  2 000U, 置于透气性培养袋中 37 $^{\circ}$ C, 悬浮培养, 次日加 rhIL-2 1 000U/ml, anti-CD3 McAb 50ng/ml, 培养 4、7、10、13d 进行细胞表型分析, 调整细胞浓度, 补充 rhIL-2。培养后同时进行 B-CLL 相关分子标志的检测。采用苔盼兰染色法检测细胞活力并计数细胞数量。

**4 CIK 细胞体外杀瘤活性检测** 以 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji (购自中国医学科学院肿瘤细胞库, 为美国 ATCC 来源) 为靶细胞, 采用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放细胞毒检测法检测 CIK 细胞对 Raji 的溶瘤活性。实验步骤参照 CytoTox96 非放射性细胞毒检测试剂盒 (购自 Promega, Madison, WI, 美国)。以患者外周血淋巴细胞 (peripheral blood lymphocytes, PBL) 作为对照, 在效应细胞与靶细胞比为 1:1、10:1 和 40:1, 共培养 4h 后, 利用酶标仪检测 490nm 的吸光度值代表 LDH 释放水平。LDH 释放代表 CIK 细胞的细胞毒活性, 以百分比表示, 依据如下公式计算:

细胞毒活性百分比 (%) = [(实验组 LDH 释放 - 效应细胞和靶细胞自发 LDH 释放) / (靶细胞最大 LDH 释放 - 靶细胞自发 LDH 释放)]  $\times$  100

**5 胸腺肽免疫增强方案** 采用胸腺肽  $\alpha 1$  作为免疫增强药物, 用法为 1.6mg/d, 皮下注射, 14d 为 1 周期。采集 4 例 B-CLL 患者 PBMC, 每周采集 1 次, 分别在应用胸腺肽  $\alpha 1$  前和应用 1 周期后各采集 3 次, 按上述 CIK 细胞制备方法培养, 观察对比应用胸腺肽  $\alpha 1$  前、后 CIK 细胞在扩增数量、效应细胞扩增倍数、淋巴细胞亚群比例及体外杀瘤活性的变化。

**6 统计学处理** 应用 SPSS12.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 4 例老年 B 细胞性慢性淋巴细胞白血病患者临床资料

Tab 1 Clinical data about 4 elderly patients with B-CLL

Case	Gender	Age (yrs)	Diagnosis	Initial stage	Complications	Previous treatment	Disease state
1	Male	82	B-CLL	II B	Hypertension, COPD, chronic hepatitis B	RF $\times$ 2	PR
2	Male	78	B-CLL	III A	Hypertension, CHD, PAF	chlorambucil $\times$ 1, RF $\times$ 2	PR
3	Male	85	B-CLL	III A	Hypertension, alveolar cell carcinoma of right lung, CKD	R-FP $\times$ 2	PR
4	Male	90	B-CLL	III B	Hypertension, diabetes mellitus II, CHD	R-FP $\times$ 3	SD

COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CHD: coronary heart disease; PAF: paroxysmal atrial fibrillation; CKD: chronic kidney disease; RF: rituximab plus fludarabine; R-FP: rituximab, fludarabine and prednisone; PR: partial remission; SD: steady disease.

### 结果

**1** CIK 细胞培养质量控制 每例患者的 CIK 细胞培养过程中均进行多次细菌、真菌和支原体检测, 由本院微生物科和本实验室同时检测, 结果均为阴性者报告为阴性。所有样本检测结果均为阴性。  
**2** 胸腺肽  $\alpha 1$  免疫增强治疗前后 CIK 细胞的生物学变化 4 例患者在胸腺肽  $\alpha 1$  治疗前后分别各做 3 次 CIK 细胞培养, 共 24 次, 均获成功。外周血淋巴细胞扩增培养平均时间  $(13.8 \pm 1.4)d$ , 细胞存活率为  $95.46\% \pm 3.12\%$ 。培养后  $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD3^+CD8^+$  及  $CD3^+CD56^+T$  细胞比例均显著升高, 而  $CD3^+CD4^+T$  细胞比例无统计学意义。胸腺肽  $\alpha 1$  治疗后, CIK 细胞在扩增数量、扩增倍数、效应淋巴细胞亚群比例及体外杀瘤活性四个方面均

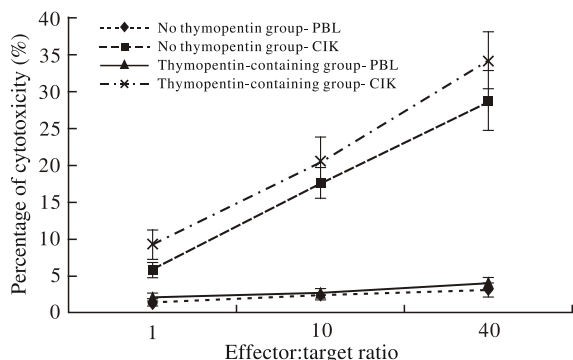


图 1 CIK 细胞对 Raji 细胞系的杀瘤活性  
 Fig 1 Tumoricidal activity of CIK cells in Raji cell line

明显高于治疗前 (表 2、3, 图 1、2)。通过对培养成熟的 CIK 细胞进行流式细胞仪检测, 未见表型异常的 B-CLL 细胞。

### 讨论

B 细胞性慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL) 是一种形态上成熟的小淋巴细胞恶性克隆性疾病, 呈惰性临床过程, 但不易治愈<sup>[8-9]</sup>。近年来 CLL 发病呈上升趋势, 主要见于老年人, 发病中位年龄为 72 岁<sup>[10]</sup>。由于衰老所致生理及免疫功能退化常合并多种慢性基础疾病, 加之 CLL 进展抑制骨髓造血及免疫功能, 使得患者对化疗耐受性差, 从而限制了细胞毒药物的应用。鉴于 70 岁以上老年进展期 CLL 治疗的主要目标是延缓疾病进展、减轻症状、改善生活质量和延长生存期<sup>[11]</sup>, 为此, 探寻化疗以外安全性好、疗效可靠的生物治疗方法对于改善老年 CLL 的预后具有重要意义。CIK 细胞治疗是目前抗肿瘤过继细胞免疫治疗最有效的方案<sup>[12]</sup>, 它是外周血单个核细胞体外经过多种细胞因子 (rhIFN- $\gamma$ 、rhIL-2 和 anti-CD3 McAb 等) 共同诱导而获得的一群异质细胞, 同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子, 故也被称为 NK 细胞样 T 淋巴细胞, 同时具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞非 MHC 限制性杀瘤特点。

老年 B-CLL 患者除衰老所致淋巴细胞生成减少和免疫功能下降外, 慢淋白血病的克隆性

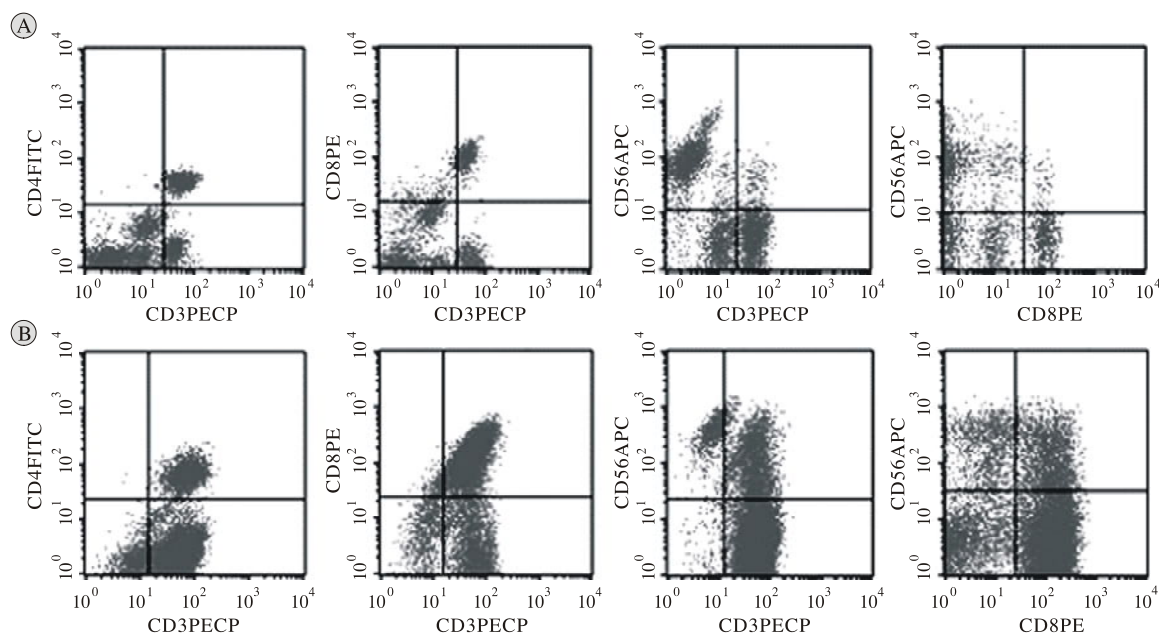


图 2 1 例 B-CLL 患者 CIK 细胞培养前后典型的淋巴细胞亚群变化  
 Fig 2 Typical subgroups of lymphocytes in a patient with B-CLL before and after culture of CIK cells. A: phenotypic analysis of PBL.  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$ , and  $CD8^+$  cells accounted for 35.8%, 12.43%, 3.85%, and 13.35%, respectively. B: phenotypic analysis of CIK cells.  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD56^+$ , and  $CD8^+$  cells accounted for 94.14%, 73.62%, 16.93%, and 74.82%, respectively.

表 2 胸腺肽  $\alpha 1$  治疗前后 CIK 细胞扩增数量及倍数的变化Tab 2 Subgroups of lymphocytes before and after culture(n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Cell counts before culture( $\times 10^9$ )	Cell counts after culture( $\times 10^9$ )	Amplification fold
No thymopentin	0.31 $\pm$ 0.62	2.47 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	7.97
Thymopentin-containing	0.36 $\pm$ 0.45	6.78 $\pm$ 1.39 <sup>ab</sup>	18.83 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.01, vs pre-culture; <sup>b</sup>P<0.01, vs no thymopentin group

表 3 胸腺肽  $\alpha 1$  治疗前后 CIK 细胞亚群的变化Tab 3 Number of CIK cells and their amplification folds before and after culture(n=12,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Item	No thymopentin group		Thymopentin-containing group	
	Pre-culture	Post-culture	Pre-culture	Post-culture
CD3 <sup>+</sup>	28.1 $\pm$ 5.64	90.16 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	35.25 $\pm$ 4.37	95.89 $\pm$ 3.65 <sup>ab</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	17.67 $\pm$ 5.13	16.21 $\pm$ 4.85	16.82 $\pm$ 3.72	15.37 $\pm$ 4.06
CD8 <sup>+</sup>	26.39 $\pm$ 7.63	73.27 $\pm$ 8.78 <sup>a</sup>	36.78 $\pm$ 6.24	84.17 $\pm$ 4.23 <sup>ab</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	23.26 $\pm$ 6.39	72.61 $\pm$ 10.26 <sup>a</sup>	33.64 $\pm$ 4.58	76.41 $\pm$ 6.24 <sup>ab</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2.05 $\pm$ 1.47	12.25 $\pm$ 5.88 <sup>a</sup>	3.78 $\pm$ 2.39	19.42 $\pm$ 4.34 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P<0.01,vs pre-culture; <sup>b</sup>P<0.05, vs no thymopentin group

扩增也抑制了 T 淋巴细胞功能。我们前期对老年淋巴瘤、骨髓增生异常综合征进行自体 CIK 细胞治疗发现,连续多疗程输注及应用胸腺肽免疫增强治疗是 CIK 细胞更好发挥疗效的关键所在<sup>[1-5]</sup>。为此,本研究选取具有细胞免疫功能缺陷的老年 B-CLL 患者作为研究对象,观察胸腺肽  $\alpha 1$  免疫增强治疗对患者来源的 CIK 细胞扩增数量、效应细胞扩增倍数、淋巴细胞亚群比例及体外杀瘤活性的影响。本研究纳入的 4 例患者,均合并 3 种以上慢性基础病,以高血压、冠心病最常见。先前均接受 2-3 个疗程以利妥昔单抗联合氟达拉滨为主的免疫化疗,3 例达 PR、1 例 SD。对患者进行胸腺肽  $\alpha 1$  治疗,结果表明,在体外扩增培养时间和细胞存活率上均与以往研究的老年淋巴瘤和骨髓增生异常综合征类似<sup>[3-5]</sup>,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T 细胞比例均显著升高;尤其在胸腺肽  $\alpha 1$  治疗后,CIK 细胞的体外扩增及

杀瘤活性均明显高于治疗前,同时,慢淋白血细胞得到彻底清除。本研究结果为进一步开展以免疫增强治疗老年 B-CLL 提供了实验依据。

### 参考文献

- Lu XC, Yang B, Yu RL, et al. Clinical study of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62 ( 1 ): 257-265.
- 杨波, 卢学春, 朱宏丽, 等. 自体 CIK 细胞联合 IL-2 治疗老年人 B 细胞性恶性淋巴瘤的临床研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18 ( 5 ): 1244-1249.
- 刘洋, 包尔宁, 杨波, 等. 自体 CIK 细胞输注治疗老年骨髓增生异常综合征的临床研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19 ( 3 ): 787-792.
- 杨洋, 杨波, 脱帅, 等. 含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2 方案治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤 [J]. 军医进修学院学报, 2012, 33 ( 5 ): 441-443, 459.
- 蔡力力, 杨波, 卢学春, 等. 免疫功能检测对评估细胞因子诱导的自体杀伤细胞治疗老年血液肿瘤疗效的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18 ( 5 ): 1250-1255.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997 [J]. J Clin Oncol, 1999, 17 ( 12 ): 3835-3849.
- CLL Trialists' Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91 ( 10 ): 861-868.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment [J]. Blood, 1996, 87 ( 12 ): 4990-4997.
- Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: 163-183.
- Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. Previous Version: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006 [EB/OL]. http://seer.cancer.gov/csr/1975\_2006.
- Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia [J]. J Hematol Oncol, 2009, 2: 29.
- Hontscha C, Borck Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137 ( 2 ): 305-310.