

CIK 细胞治疗对鼻咽癌患者肿瘤标志物及生活质量的影响

刘宜敏^{1*}, 何 艳¹, 吴燕峰², 廖 恺¹, 王潇娉²

(中山大学孙逸仙纪念医院 1.肿瘤科;2.生物治疗中心,广东 广州 510120)

摘要:【目的】观察鼻咽癌患者回输自体 CIK 细胞后临床症状缓解情况及 EB 病毒指标变化。【方法】收集鼻咽癌病例 42 例,其中放化疗联合 CIK 组 21 例进行 CIK 生物治疗(参照美国斯坦福大学骨髓移植中心建立的 CIK 细胞培养方法诱导扩增 CIK 细胞, CIK 细胞培养 14 d 后分次回输给患者)及进行放疗或/和化疗,放化疗组 21 例仅进行放疗或/和化疗。【结果】随访 6~27 个月,中位随访时间 14.5 个月,放化疗联合 CIK 组食欲明显改善,并且其肿瘤标志物(VCA-IgA、EA-IgA、EA-IgG 及 EBV-DNA)均较放化疗组明显降低;但治疗有效率并无统计学差异。【结论】CIK 生物治疗安全可靠,有效降低 EBV 抗体滴度并提高食欲,改善睡眠,但并未提高治疗有效率。

关键词: 鼻咽肿瘤; CIK 细胞; 生物治疗; 生活质量

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)04-0491-04

Effect of Adoptive Immunotherapy with Auto-cytokine Induced Killer Cells on Tumor Markers and General Condition of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

LIU Yi-min^{1*}, HE Yan¹, WU Yan-feng², LIAO Kai¹, WANG Xiao-ping²

(1. Department of Radiotherapy; 2. Department of Biological Treatment Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the remission of the symptom and the antibodies of EB virus after the CIK cells being transfused back to the patients with nasopharyngeal cancer. 【Methods】 42 cases were enrolled, and 21 patients (group A) received not only chemotherapy and radiotherapy but also adoptive immunotherapy with auto-cytokine induced killer cells compared with the other 21 patients (group B) who only accepted radiotherapy and chemotherapy. 【Result】 During the following 6-27 months (median: 14.5 months), the antibodies of VCA-IgA, EA-IgA, EA-IgG, and EBV-DNA in group A were all lower than that in group B. And also was the appetite. But in group A, the efficiency of treatment was not improved compared with group B. 【Conclusion】 Adoptive immunotherapy with auto-cytokine induced killer cells is safe and effective in clinical, and it can degrade VCA-IgA, EA-IgA, EA-IgG, and EBV-DNA which are increased in the patients with nasopharyngeal cancer, and it also improve the quality of living of the patients. But it did not improved the treatment efficiently.

Key words: nasopharyngeal neoplasm; adoptive immunotherapy; auto-cytokine induced killer cells; life quality

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):491-494]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma),又称“广东瘤”。放疗为其主要的治疗方法,放疗联合化疗可提高鼻咽癌的疗效。1966年 Old 等应用免疫扩散法首次发现 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)和鼻咽癌有血清学关系^[1]。姜勇男等^[2]对比了鼻咽癌患者及正常人血清中 EBV 四种特异性 IgG 抗体,

其中 VCA-IgG、EBNA-IgG、EA-IgG 的几何平均滴度鼻咽癌患者显著高于正常人;EA-IgG 的阳性率也显著高于正常人。在随后鼻咽癌的病因学研究中亦证明 EB 病毒与鼻咽癌发生发展关系密切,其 DNA 水平与肿瘤负荷密切相关,且患者体内缺乏杀灭 EB 病毒的特异性 CTL 细胞^[3-4]。有研究认为

收稿日期:2011-02-28

基金项目:广东省科技计划项目(2009B030801119)

作者简介:刘宜敏,副主任医师,研究方向为头颈部肿瘤的放射治疗,*通信作者, E-mail: liuyimn@139.com

鼻咽癌治疗失败的原因也与肿瘤患者细胞免疫缺陷有关^[5]。随着肿瘤免疫学、分子生物学和生物工程技术的发展,肿瘤的生物治疗开始成为继肿瘤手术治疗、放疗和化疗三大常规治疗之后的第四种肿瘤治疗模式。CIK (cytokine induced killer cells, CIK cell)细胞就是一种新型的免疫活性细胞^[6],具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和非主要组织相容性复合体(MHC)限制性杀瘤的优点,与其他过继性免疫治疗细胞相比,具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广等优点。其中 CD3⁺CD56⁺T 细胞是 CIK 群体中主要效应细胞。本实验试图通过观察回输自体 CIK 细胞后,患者 EB 抗体滴度变化及一般情况(体质量、食欲、白蛋白、血红蛋白等)的变化来探讨其在鼻咽癌治疗中的作用。

1 材料和方法

1.1 病例选择

中山大学附属第二医院 2008 年 6 月至 2010 年 6 月以前收治的鼻咽癌患者 42 名,其中男性 37 例,女性 5 例,年龄 25 ~ 80 岁,中位年龄 46 岁。肿瘤临床分期(按 UICC02 分期)包括:Ⅱ期 4 例(均是Ⅱb 期),Ⅲ期 10 例,Ⅳ期 26 例(其中Ⅳa 期 12 例,Ⅳb 期 10 例,Ⅳc 期 4 例)。病理类型:鼻咽未分化型非角化性癌 38 例,鼻咽分化型非角化性癌 4 例。前期治疗方式包括:单纯放疗 4 例,放疗+化疗 38 例,放疗剂量:鼻咽局部剂量 69.6 ~ 79.4 Gy,中位剂量 71.3 Gy,颈部淋巴结引流区照射剂量:59.6 ~ 69.6 Gy,中位剂量 61.2 Gy。化疗方案包括:多西他赛/紫杉醇+铂类,在接受生物治疗前复查患者鼻咽 MR,鼻咽肿块及颈部淋巴结均达到肉眼即 MR 检查完全消除。根据患者年龄、性别、病理类型、临床分期、放疗剂量、化疗方案及化疗周期对上述 42 例病人进行配对分组,放化疗联合 CIK 组进行 CIK 生物治疗,放化疗组予以观察。

1.2 仪器与主要试剂

Forma1205 型生物安全柜;Forma311 型 CO₂ 培养箱;CS-3000PLUS 血细胞分离仪;FACSAsia 流式细胞仪;Human Th1/Th2 Cytokine Kit 由 BD 公司提供;无血清培养基(AIMV) GIBCO 公司提供。

1.3 CIK 细胞体外扩增

采集患者静脉血约 60 mL,用 Ficoll 分离并收集单个核细胞,用 PBS 洗涤 3 次,将细胞按 2 ×

10⁶/mL 悬浮于 AIMV 完全培养基中。当天加入 IFN- γ 500 u/mL,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养 24 h,第 1 天加入 IL-1 100 u/mL,CD3、IL-2^[7] 10 ng/mL 继续培养,每天观察细胞生长并根据情况进行扩增。以后每 3 d 换液 1 次,并补充 IL-2 300 u/mL,调整细胞数为 2 × 10⁶/mL,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中连续培养 10~12 d 后台盼蓝计数。经生理盐水洗 3 次后,加入 1% 人血白蛋白生理盐水中回输。每 15 d 回输 1 次。

1.4 CIK 细胞表型

病人回输前,取培养好 CIK 细胞,FITC-抗 CD3、PE-抗 CD56 (Coulter) 各 20 μ L,分别加入 FCM 专用试管内。取待测细胞,用 Hank's 液洗 2 次后,各取 1 × 10⁶/mL,分别加入相应的 FCM 管中,4℃避光孵育 30 min,每 10 min 摇晃 1 次。用 Hank's 液洗 2 次,立即上流式细胞仪进行分析。

1.5 临床观察与抗体滴度检测

观察细胞悬液回输时患者的不良反应,按照 WHO 统一标准评价毒性^[8]。在本实验中,将生活质量分为四个等级,分别为较差、一般、较好、非常好。采用酶联免疫法检测患者 EA-IgG 抗体浓度,免疫酶标法检测患者血清中 VCA-IgA 及 EA-IgA 抗体滴度,免疫荧光定量检测 EBV-DNA 量。

1.6 疗效评定标准

参照 WHO 实体瘤疗效评定标准:完全缓解(complete remission, CR):所有可见病变完全消失并至少维持 4 周以上;部分缓解(partial remission, PR):肿瘤最大横径与垂直径(二径)乘积减少 50%以上,并持续 4 周以上;好转(mend remission, MR):肿瘤病灶二径乘积缩小 25%以上,但 < 50%,无新病灶出现;稳定(stable disease, SD):肿瘤病灶二径乘积缩小 < 25%或增大 < 25%,无新病灶出现;进展(progress disease, PD):肿瘤病灶二径乘积增大 25%以上或有新病灶出现。

1.7 统计方法

所有数据均经 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。分类资料的比较均采用了 Fisher 确切概率法检验,计量资料采用两样本配对 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 回输 CIK 细胞数量及回输次数

21例放化疗联合 CIK 组患者,包括 3 例女性,18 例男性,经过病理活检、鼻咽 MR、胸片、腹部 B 超等检查确诊并明确无远处转移,在放疗及化疗结束后接受 CIK 生物治疗均大于 4 次。抽血后均成功培养 CIK 细胞,回输细胞数量大于 1×10^9 个,平均细胞数量 1.7×10^9 个。两组随访时间 6 ~ 27 个月不等,中位随访时间 14.5 个月。

2.2 临床观察

生活质量等级有提高即认为改善。放化疗联合 CIK 组患者精神改善者 19 例,睡眠改善者 15 例,食欲及心情改善 20 例,而放化疗组精神改善 16 例($P = 0.171 > 0.05$),睡眠改善 14 例($P = 0.5 > 0.05$),食欲改善仅 8 例($P = 0.047 < 0.05$),及心情改善 20 例($P = 0.512 > 0.05$)。21 例患者在回输过程中均未出现发热、寒战、皮疹等不适。取放化疗结束时及结束后半年两个时间点,分别观察患者血红蛋白、白蛋白、体质量等变化,放化疗联合 CIK 组体质量平均增加 0.73 kg,放化疗组平均增加 0.17 kg,统计学上无差异($P = 0.616 > 0.05$)。放化疗联合 CIK 组及放化疗组两时间点白蛋白($P = 0.927 > 0.05$)及血红蛋白差值均无统计学差异($P = 0.201 > 0.05$)。

2.3 肿瘤标志物观察

取上述 42 例病人放化疗结束及半年后复查两时间点,分别观察放化疗联合 CIK 组及放化疗组患者血清中 EB 病毒指标,包括 VCA-IgA、EA-IgA、EA-IgG 和 EBV-DNA。

放疗结束时,放化疗联合 CIK 组 VCA-IgA 平均滴度、EA-IgA 平均滴度、EA-IgG (RU/mL)及 DNA(copies/mL)分别为:1:188.71、1:26.04、35.05、 $1\ 809 \pm 378$;放化疗组则分别为:1:201.59、1:30.71、32.38、 $1\ 910 \pm 161$,两组无统计学差异(P 值分别为 0.680,0.437,0.335,0,0.78,均 > 0.05)。

半年后复查时,放化疗联合 CIK 组及放化疗组 VCA-IgA 平均滴度分别为 1:20.67、1:48.25($P = 0.01 < 0.05$),EA-IgA 平均滴度分别为:1:11.049、1:18.72($P = 0.01 < 0.05$);EA-IgG(RU/mL)分别为 15.29、23.7($P = 0.01 < 0.05$);DNA(copies/mL)分别为:157.3 \pm 37.7、1 300 \pm 479.5 ($P = 0.028 < 0.05$),均存在明显差异。

2.4 细胞表型

CIK 细胞主要是将人外周血中单个核细胞经细胞因子共同培养一段时间后获得的一群异质细

胞,其主要表达 $CD3^+CD56^+$ T 淋巴细胞表型。图 1 系某病人流式细胞图,显示回输细胞中 $CD3^+CD56^+$ 细胞占到 40.02%。在放化疗联合 CIK 组 21 例病人中,所有病人回输细胞 $CD3^+CD56^+$ 细胞占回输细胞 35%以上,回输的部分细胞中包括 $CD3^-CD56^+$ 的 NK 细胞,其亦具有肿瘤细胞杀伤作用。

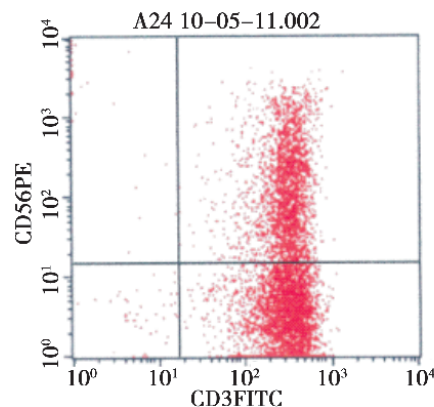


图 1 细胞因子诱导后细胞流式图

Fig.1 Flow cytometric figure of the cells induced by cytokine $CD3^+CD56^+$ cell, i.e. CIK cell, 40.02%; $CD3^+CD56^-$ cell, NK cell, 58.92%

2.5 肿瘤情况变化

放化疗联合 CIK 组中位随访时间 11.3 月,全部患者经放化疗及生物治疗后,完全缓解(CR)21 例,随访时间内无复发及转移,总有效率 100%,放化疗组中位随访时间 17.7 月,完全缓解 21 例,其中 1 例在放疗后 14 月出现局部复发,总有效率为 95%,使用 Fisher 确切概率法, $P = 0.5 > 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤免疫学研究表明,机体的免疫功能随着肿瘤的不断生长而进行性下降,特别是晚期带瘤机体的各种特异性和非特异性的细胞与体液免疫功能均受到显著抑制。国内外研究结果指出,多种肿瘤患者有 T 细胞亚群状态异常和比例失调,其 $CD4/CD8$ 比值的降低与病变程度相关^[9-10]。

研究表明 EBV 逃逸 CTL 杀伤作用的一个机制是它的抗原多肽可以突变。CTL 的杀伤作用受 HLA-A II 抗原限制,靶细胞上抗原决定簇突变可逃逸 CTL 的毒性作用。EBV 感染干扰了抗原的降解和提呈,使得 MHC-I 类分子复合物及黏附分子表达减弱,进而抑制 CTL 对靶细胞的识别杀伤。

CIK细胞可通过三种途径发挥杀瘤、溶瘤作用,即:①即在体内受某些淋巴因子作用后,CIK细胞大量释放具有细胞毒性的胞浆颗粒到胞外,这些颗粒直接破坏瘤细胞;②进入体内活化的CIK细胞可分泌多种细胞因子如干扰素、肿瘤坏死因子和白细胞介素-2等,不仅对肿瘤细胞有直接抑制作用,而且还可通过调节免疫系统间接杀伤瘤细胞;③CIK细胞表达 FasL 可诱导肿瘤细胞凋亡,但 CIK 细胞由于有抗凋亡基因表达,因此在体内能抵抗 FasL 阳性肿瘤细胞对的反作用,故能对肿瘤细胞发挥持久的溶瘤作用^[11-12]。

因此,体内回输 CIK 细胞,可以在没有损伤机体免疫系统结构和功能的前提下,直接杀伤肿瘤细胞,并可调节和增强机体的免疫功能,因而成为肿瘤治疗及巩固治疗疗效的重要方法,为预防肿瘤复发、改善晚期患者的生活质量提供了新途径^[13]。

一般选择在放疗、化疗后间隔 2~4 周,机体免疫力有所恢复时,输入 CIK 细胞,可提高肿瘤患者的缓解率,并在清除微小残留病灶方面发挥着重要作用^[14]。

本研究中显示,在 42 例鼻咽癌患者中,经过放疗、化疗及 CIK 生物治疗,病人的体质量、胃口、营养状况明显提高,肿瘤标志物亦明显下降。秦海燕^[15]的研究结果(除外 EA-IgG)亦与之一致。由于鼻咽癌对放疗及化疗比较敏感,在放化疗联合 CIK 组与放化疗组中,治疗有效率并无明显差异,这可能与随访时间较短有关。同时,由于随访时间较短,无病生存率、中位生存期亦无进行统计。因此,其远期疗效有待于进一步研究。

目前在鼻咽癌的治疗中,随着放疗的愈加精确,三维适形放疗、调强放疗的发展以及化疗药物的更新,鼻咽癌的 5 年生存率已达到 80%以上,并且治疗中的副作用,比如说颞颥关节纤维化、颅底骨坏死等均不同程度的减少和避免。但是,如何更进一步地提高局部控制率,降低远期复发率及转移,提高病人治疗过程中及治疗结束后的生活质量,已经成为现在医疗工作者及病人的追求,相信生物治疗会给人们带来新的思考和方向。

参考文献:

[1] Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, et al. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured burkitt's lymphoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci

USA, 1966, 56(6): 1699-1704.

- [2] 姜永男,李燕,王新江,等.鼻咽癌患者血清中 EB 病毒四种异性 IgG 抗体的测定[J]. 延边医学院学报, 1994, 17(2): 85-89.
- [3] Lo YM, Chan LY, Chan AT, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(21): 5452-5455.
- [4] Gottschalk S, Heslop HE, Roon CM. Treatment of Epstein-Barr virus-associated malignancies with specific T cells[J]. Adv Cancer Res, 2002, 84: 175-201.
- [5] Lin X, Gudgeon NH, Hui EP, et al. CD4 and CD8 T cell responses to tumour-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57(7):963-975.
- [6] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cell recognition of cytokine-induced killer cells[J]. Exp Hematol, 1993, 21(13): 1673-1679.
- [7] 吴燕峰,林永潮,黎阳,等.最优化细胞因子诱导杀伤细胞/自然杀伤细胞少因子培养体系的探索 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2009, 30(4): 361-365.
- [8] 孙燕. 内科肿瘤学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 994-997.
- [9] Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, et al. Reversed CD4 /CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma [J]. Cancer, 1999, 86(8): 1537-1543.
- [10] Robinson E, Segal R, Struminger L, et al. Lymphocyte subpopulations in patients with multiple primary tumors [J]. Cancer, 1999, 85(9): 2073-2076.
- [11] Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, et al. Generation of CD3+CD56+cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells[J]. Int J Hematol, 2003, 77(2): 175-179.
- [12] 胡礼仪,张有顺,周新,等. CIK 细胞的诱导及对肝癌细胞毒作用的体外研究[J]. 中国医师杂志, 2005, 7(5): 604-606.
- [13] 李淑艳,邢淑贤. CIK 细胞的特点及其在肿瘤生物治疗中的作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(5): 424-426.
- [14] 刘继斌,施玲燕,刘晓玲,等. CIK 细胞治疗中晚期消化系统肿瘤的临床研究 [J]. 肿瘤基础与临床, 2008, 21(13): 252-254.
- [15] 秦海燕,胡伟汉,张晓实,等. CIK 细胞联合白介素-2 对鼻咽癌病人免疫功能及 EB 病毒指标的影像[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(12): 1747-1749.

(编辑 张思健)