

肿瘤诊断与基因治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.01.007

自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肾癌的临床观察

吕心亭¹, 刘明涛¹, 张 军¹, 张 辉²

(1. 山东省德州市夏津县人民医院外三科, 德州 253200; 2. 山东大学附属省立医院东院区保健泌尿外科, 济南 250000)

【摘要】目的:探讨自体细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)治疗肾癌的临床疗效。**方法:**将 71 例肾癌患者随机分入 2 组, 其中治疗组 36 例, 对照组 35 例, 2 组患者均先行手术切除, 治疗组术后给予白细胞介素(interleukin, IL)-2 和干扰素(interferon, IFN)治疗, 然后再行 CIK 细胞回输治疗。对照组术后仅给予 IL-2 和 IFN 治疗。观察 2 组患者的免疫功能、生活质量、生存率及不良反应。**结果:**治疗组治疗后 CD3⁺、CD4⁺及 CD16⁺CD56⁺显著上升, CD8⁺细胞显著下降, 与治疗前比较有明显统计学差异。对照组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值及 CD16⁺CD56⁺及 CD8⁺均无显著变化。治疗组生活质量(quality of life, QOL)评分改善 83.3%, 明显高于对照组的 57.1%, 2 组比较差异有统计学意义。治疗组和对照组的 1 年生存率分别为 91.7% 和 80.0%, 1 年转移率分别为 13.9% 和 22.9%, 1 年复发率分别为 5.6% 和 11.4%, 2 组比较差异均无统计学意义。治疗组和对照组的毒副反应比较差异无统计学意义。**结论:**CIK 细胞联合手术治疗肾癌可以提高肾癌患者的免疫功能, 改善生活质量。

【关键词】肾癌; 手术治疗; 自体细胞因子诱导的杀伤细胞**【中图分类号】**R737.11**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-30Clinical observation of autologous cytokine-induced killer cells
in the treatment of renal cell carcinomaLyu Xinting¹, Liu Mingtao¹, Zhang Jun¹, Zhang Hui²

(1. Department of Surgery, People's Hospital of Xiajin County in Dezhou City of Shandong Province;

2. Department of Urology Surgery, East Branch, Provincial Hospital Affiliated To Shandong University)

【Abstract】Objective: To observe the clinical efficacy of autologous cytokine-induced killer cells (CIK) in the treatment of renal carcinoma. **Methods:** Totally 71 patients with renal carcinoma were randomly divided into treatment group ($n=36$) and control group ($n=35$). Patients in treatment group and control group were received surgical resection first. Then patients in treatment group were treated with interleukin-2 and interferon treatment postoperatively and received CIK cell transfusion therapy at the end of treatment. Patients in control group only received interleukin-2 and interferon treatment. Immune function, quality of life, survival rate and adverse reactions were analyzed. **Results:** Ratios of CD3⁺, CD4⁺ and CD16⁺CD56⁺ were increased while those of CD8⁺ were decreased significantly after the treatment compared with those before the treatment in treatment group. There was no significant change before and after the treatment in ratios of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD16⁺CD56⁺ and CD8⁺ in control group. Quality of life of 83.3% patients in the treatment group was improved while that of 57.1% patients in control group was improved, with statistical differences between two groups. One-year survival rates in treatment group and control group were 91.7% and 80.0%, one-year transfer rates in two groups were 13.9% and 22.9% and one-year recurrence rates in two groups were 5.6% and 11.4%, respectively, without statistical differences between two groups. There was no statistical difference in side effects between treatment group and control group. **Conclusions:** CIK cells combined with surgical treatment can improve immune function and quality of life of patients with renal carcinoma.

【Key words】renal carcinoma; surgical treatment; cytokine-induced killer cells

肾癌在泌尿系肿瘤中发病率居第 2 位, 早期肾癌主要以手术切除为主, 但术后局部复发率仍高达 30%~40%, 约 50% 的患者在术后发生复发和远处转移, 肾癌术后的 5 年生存率为 35%~40%^[1]。因此肾癌根治性切除术后如何控制转移和复发是亟待解

决的问题。肾癌以透明细胞癌最为多见, 对放疗、化疗均不敏感, 由于肾癌是一种免疫原性较强的肿瘤, 因此免疫治疗成为肾癌重要的辅助治疗方法^[2]。研究表明, 细胞因子诱导的杀伤细胞具有提高肿瘤患者机体免疫力, 清除体内微小残余病灶的作用。我科将自体细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)联合白细胞介素(interleukin, IL)-2 和干扰素(interferon, IFN)应用于肾癌术后的

作者介绍: 吕心亭, Email: dingsentai@126.com,

研究方向: 泌尿外科。

通信作者: 张 辉, Email: sdzhanghui1979@126.com。

患者,取得了良好的疗效,现籍本文报道之。

1 资料与方法

1.1 参试者一般资料

选取我院自 2009 年 2 月至 2011 年 6 月收治的肾癌患者 71 例,年龄 34~79 岁,平均 (63.4 ± 22.9) 岁。按照入院先后顺序将患者随机分入治疗组和对照组,治疗组 36 例,对照组 35 例。患者入组标准为:(1)所有患者经病理证实为肾癌,均无远处转移;(2)心电图正常,白细胞 $>3.5 \times 10^9$ 个/L,中性粒细胞 $>1.5 \times 10^9$ 个/L,血小板 $>100 \times 10^9$ 个/L,肾功能肌酐小于上限正常值 1.5 倍;(3)Karnofsky 评分(karnofsky score,KPS) ≥ 70 分,预计生存时间大于半年;(4)患者均无免疫系统或感染性疾病;(5)治疗前后 3 个月均未接受过放化疗或影响免疫功能药物。2 组患者的性别、年龄、KPS、病理类型、肿瘤分期等一般资料比较差异无统计学意义,见表 1。

1.2 主要试剂与仪器

抗 CD3-PE、抗 CD4-PE、抗 CD16-PE、抗 56-PE、抗 CD8-PE(均为美国 BD 公司),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),基因重组人 IL-2(rh-IL-2),基因重组 γ -IFN(rh-IFN- γ)(均为 R&D 公司),无血清培养基 AIMV(美国 Invitrogen 公司),T 细胞亚群试剂盒(美国 Sigma 公司),流式细胞仪 EPICSXL(美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 治疗方法

1.3.1 治疗组和对照组均先行手术切除,术后治疗组给予 IL-2 和 IFN 治疗,治疗结束后再行 CIK 细胞回输治疗。对照组仅给予 IL-2 和 IFN 治疗。

1.3.2 手术方法 所有患者均行肾癌根治术,切除范围:肾周筋膜、肾周脂肪、患肾、同侧肾上腺、肾门淋巴结及髂血管分叉以上输尿管。

1.3.3 IL-2 和 IFN 用法 术后如无发热,伤口愈合不良等,第 14 天时开始给予 IL-2 和 IFN 治疗,具体用药为:rh-IFN- γ 300 万 IU/次,皮下注射,隔日 1 次,30 d 为 1 个治疗周期;IL-2,100 万 U,加入 500 ml 0.9%氯化钠溶液中静脉点滴,1 次/d,30 d 为 1 个治疗周期。

CIK 细胞培养与回输:治疗组患者术后在 IL-2 和 IFN 治疗前通过血细胞分离机采集外周血单个核细胞约 40 ml,用淋巴细胞分离液将其分离纯化,后调整细胞浓度并加入 IFN- γ ,然后将其置于培养箱培养 2 h。将非贴壁细胞计数并用含 10%人 AB 血清的 MDM 细胞调整液调整细胞浓度,然后分别加入 IFN- γ 、CD3McAb 及 IL-2 继续培养。培养至 14 d 取少量 CIK 细胞检测细菌、真菌及内毒素,并检测其表面标

志,检测合格后将细胞混悬于生理盐水中,用输血器回输给患者,每次输注细胞数约为 $(1.0 \sim 5.0) \times 10^9$ 个,1 d 1 次,连输 3 d^[7-8]。

1.4 观察指标及疗效判定

观察指标:包括免疫功能、生活质量(quality of life, QOL)、生存期及不良反应。患者 QOL 变化应用 KPS 来评价,QOL 改善:治疗后 KPS 增加 ≥ 10 分;QOL 稳定:治疗后 KPS 变化 <10 分;QOL 降低:治疗后 KPS 减少 ≥ 10 分。在 IL-2 和 IFN- γ 治疗前 2 d 左右用流式细胞仪检测治疗组患者 NK 细胞和 T 细胞亚群,在 CIK 细胞回输后 2 周再检测 NK 细胞和 T 细胞亚群,T 细胞亚群即 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺,NK 细胞即 CD16⁺CD56⁺。对照组在 IL-2 和 IFN- γ 治疗前 2 d 和治疗结束后 2 周行 T 细胞亚群和 NK 细胞检测。生存期:从治疗开始至死亡或末次随访时间。细胞回输过程中,观察患者有无过敏、休克等不良反应。

1.5 统计学处理

随机分组方法:完全随机。以 Excel 随机函数生成约 80 个随机数,均乘以 2 后再以 Excel 简单取整函数取整,得 0 或 1 的随机数各约 40 个。参试患者顺序取随机数,为 1 者入治疗组,为 0 者入对照组。

资料统计方法:采用统计软件 SPSS 18.0 进行统计学处理。试验资料中的计数资料,采用率和构成比表示,非等级计数数据行 χ^2 检验(常规卡方检验及校正卡方检验);等级计数数据行秩和检验;计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述之,组间比较采用成组 t 检验,组内治疗前后的比较为配对 t 检验。因进行了多指标多次比较,为降低 I 类统计风险,适当调整检验水准,取 $\alpha'=0.05/K$ 。

2 结果

2.1 免疫功能资料分析

各项指标资料见表 2。

治疗前的各项指标:2 组基本相似。经组间 t 检验比较,均无统计学意义。证明 2 组治疗后的试验效应应具有可比性。

治疗后的各项指标:2 组差异明显。经比较多数均有统计学意义。提示试验的效应明显。从数据看:治疗组 T 细胞亚群中的 CD3⁺、CD4⁺及 NK(CD16⁺CD56⁺)明显上升,CD8⁺明显下降,治疗后与治疗前比较差异有统计学意义。

治疗前后的各指标差值:经配对 t 检验知,治疗组多数均有统计学意义,向趋好方向变化,而对照组差异均无统计学意义。从而佐证治疗组的治疗效果很好。

表 1 治疗组和对照组患者的一般资料比较

Tab.1 Comparison on general data between treatment group and control group

组别	例数 (n)	性别(例)		年龄 (岁)	KPS (分)	病理类型			肿瘤 TNM 分期			
		男	女			透明细胞癌	嫌色细胞癌	神经内分泌癌	I	II	III	IV
治疗组	36	20	16	63.8 $\pm$ 24.6	84.8 $\pm$ 16.1	28	5	3	9	12	10	5
对照组	35	14	21	62.9 $\pm$ 27.8	86.6 $\pm$ 17.3	30	3	2	7	8	13	7
t 或 χ^2 ,P 值		1.72,0.190		0.14,0.885	0.45,0.651	0.76,0.686			1.76,0.624			

注:组间比较,年龄及 KPS 为计量资料,成组 t 检验;其他为非等级计数资料,常规 χ^2 检验

表 2 治疗组和对照组治疗前后 T 细胞亚群和 NK 细胞比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison on subsets of T cells and NK cells before and after the treatment between treatment group and control group ($\bar{x} \pm s$)

		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺
治疗组组内比较 (n=36)	治疗前	52.78 ± 1.58	45.41 ± 3.49	43.77 ± 2.48	1.04 ± 1.41	17.14 ± 1.73
	治疗后	67.25 ± 1.47	57.04 ± 2.40	37.72 ± 1.22	1.51 ± 1.97	22.30 ± 4.28
	差值	14.47 ± 4.23	11.63 ± 8.41	6.05 ± 4.65	0.47 ± 2.82	5.16 ± 7.32
	t, P 值	20.52, 0.000	8.30, 0.000	7.81, 0.000	1.00, 0.324	4.23, 0.000
对照组组内比较 (n=35)	治疗前	52.28 ± 2.78	46.55 ± 5.88	42.56 ± 4.08	1.09 ± 1.44	17.89 ± 7.98
	治疗后	53.87 ± 3.41	48.20 ± 10.12	43.23 ± 8.25	1.11 ± 1.23	19.05 ± 4.17
	差值	1.59 ± 6.31	1.65 ± 18.63	0.67 ± 14.92	0.02 ± 2.49	1.16 ± 12.54
	t, P 值	1.49, 0.145	0.52, 0.604	0.27, 0.792	0.05, 0.962	0.55, 0.588
2 组疗前比较	t, P 值	0.93, 0.357	0.99, 0.327	1.50, 0.138	0.15, 0.883	0.54, 0.590
2 组疗后比较	t, P 值	21.36, 0.000	5.03, 0.000	3.91, 0.000	1.03, 0.308	3.24, 0.002

注:各组组长内治疗前后差值比较;配对 t 检验;2 组间的对应比较:成组 t 检验(常规 t 检验或 *Stterthwaite* 校正 t 检验);共比较 5 个指标,调整显著性水准为 0.05/5=0.01(为兼顾稳健,显著性水准仅为适当调整,未考虑组内组间比较次数)

2.2 QOL 改变

治疗结束后,治疗组有 30 例(83.3%)患者 QOL 评分得到改善,对照组有 20 例(57.1%)患者 QOL 评分得到改善,2 组的 QOL 评分改善的整体比较差异有统计学意义。见表 3。

表 3 治疗组和对照组生活质量比较 (n, %)

Tab.3 Comparison of quality of life between treatment group and control group (n, %)

组别	改善	稳定	降低
治疗组	30 (83.3%)	4 (11.1%)	2 (5.6%)
对照组	20 (57.1%)	9 (25.7%)	6 (17.1%)
Uc, P 值	2.40, 0.016		

注:等级计数资料 2 组比较行秩和检验

2.3 远期生存率、转移率和复发率比较

所有患者随访至治疗结束后 1 年,无失访患者,随访率为 100.0%,治疗组和对照组的 1 年生存率分别为 91.7%和 80.0%;1 年转移率分别为 13.9%和 22.9%;1 年复发率分别为 5.6%和 11.4%。此 3 项指标的 2 组间比较差异均无统计学意义。见表 4。此外,随访至 1 年时,治疗组有 2 例患者死于肺转移,1 例死于局部复发;对照组有 3 例死于肺转移,2 例死于脑转移,2 例死于局部复发。

表 4 治疗组和对照组 1 年生存率、转移率和复发率比较 (n, %)

Tab.4 Comparison on 1-year survival rate, transfer rate and recurrence rate between treatment group and control group (n, %)

组别 (例数)	1 年生存率	1 年转移率	1 年复发率
治疗组 (36)	33 (91.7%)	5 (13.9%)	2 (5.6%)
对照组 (35)	28 (80.0%)	8 (22.9%)	4 (11.4%)
χ^2, P 值	1.15, 0.284	0.95, 0.329	0.18, 0.669

注:非等级计数资料 2 组比较,常规卡方检验或 Yates 校正卡方检验

2.4 毒副反应

治疗组和对照组在应用 IL-2 和 IFN 过程中出现的毒副反应主要有:乏力、发热、寒战、恶心、呕吐、皮疹及体位性低

血压。不良反应多出现在治疗开始的前 2 周内,经对症治疗均可缓解,2 组患者的毒副反应发生率比较差异无统计学意义,见表 5。治疗组在回输 CIK 的过程中有 3 例患者出现发热,体温最高 37.9 °C,经对症治疗体温降至正常。2 组患者中均未出现因不能耐受毒副反应而中断治疗及死亡者。

表 5 治疗组和对照组毒副反应发生率比较 (n, %)

Tab.5 Comparison on incidence of adverse reactions between treatment group and control group (n, %)

组别 (例数)	乏力	发热、寒战	恶心、呕吐	皮疹	体位性低血压
治疗组 (36)	10 (27.8%)	13 (36.1%)	4 (11.1%)	1 (2.8%)	2 (5.6%)
对照组 (35)	12 (34.2%)	10 (28.6%)	3 (8.6%)	2 (5.7%)	1 (2.9%)
χ^2, P 值	1.32, 0.859				

注:非等级计数资料 2 组间比较,常规卡方检验

3 讨论

手术是治疗早期肾癌的主要方法,但是由于肾癌具有多药耐药基因,对放射治疗和化学治疗不敏感,因此肾癌术后的治疗手段很有限。近年来随着分子生物学和免疫学等学科的飞速发展,肿瘤的生物免疫治疗已成为继手术、放疗、化疗后的第 4 种肿瘤治疗手段。

目前肿瘤生物免疫治疗临床研究的热点主要有树突状细胞肿瘤疫苗、淋巴因子激活的杀伤细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、CD3 单克隆抗体激活的杀伤细胞、细胞毒性 T 细胞及 CIK 等。其中,CIK 又称为自然杀伤样 T 细胞,是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子共同培养一段时间后获得

的以 CD3⁺CD56⁺T 细胞为主的一群异质细胞。它具有增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广、对多重耐药肿瘤细胞敏感,对 G0 期细胞也有杀伤作用,杀瘤活性不受环孢素 A 和 FK506 等免疫抑制剂的影响,对正常骨髓造血前体细胞毒性小,能抵抗肿瘤细胞引发的效应细胞 Fas-FasL 凋亡等诸多优点,为肿瘤的免疫治疗开辟了全新的视角^[3]。它被认为是新一代肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案^[4]。本研究在肾癌患者患者应用 IL-2 及 IFN- γ 治疗的同时给予 CIK 细胞治疗,希望可以改善肾癌预后。

机体抗肿瘤免疫效应主要是 T 细胞介导的特异性抗肿瘤免疫应答,根据 T 细胞表面分化抗原将成熟 T 细胞分为 CD4 辅助/诱导 T 细胞、CD8 抑制/杀伤 T 细胞,肿瘤患者因机体免疫监视功能降低,常表现 CD4⁺T 下降,CD8⁺T 上升,CD4⁺/CD8⁺比值下降,甚至倒置^[5]。CD16 和 CD56 是 NK 细胞的表面标志,其表达下降提示细胞免疫功能下降。Hernberg 等^[6]研究发现,在黑色素瘤免疫治疗中,早期外周血 CD4⁺/CD8⁺比值升高是患者预后较好的预测因子。李莉等^[7]将 70 例 I、II 期肾癌患者,随机分为 CIK 细胞治疗组和常规治疗组,CIK 细胞治疗组治疗前后 CD4⁺/CD8⁺比值和 NK 细胞比例较治疗前升高,而常规治疗组治疗前后无明显变化。本研究中治疗组在 IL-2 及 IFN- γ 治疗结束后给予 CIK 细胞治疗后患者的 CD4⁺/CD8⁺比值和 NK 细胞比例较治疗前明显升高,这与李莉等的研究结果^[7]相似,随着机体免疫功能的改善,患者 QOL 也有了明显的提高。同时,治疗组患者伴随着 T 细胞亚群的增加,说明机体对细胞因子的治疗有了反应,这也是治疗有效的 1 个观察指标。那么,CIK 能否改善肾癌术后患者的远期生存率呢?

王黎^[8]及李霞等^[9]研究发现不管是单独的 CIK 细胞治疗还是联合化疗均能提高未行手术的肾癌

患者的近期疗效,但是对于 CIK 细胞能否提高肾癌患者远期生存的研究较少。本研究中因为观察的时间仅为 1 年,但是 CIK 细胞治疗已经将肾癌患者的 1 年生存率由 80.0%提高到 91.7%,提高了十个多百分点,也许随着观察时间的延长,治疗组的远期生存率会明显高于对照组患者,这也是本研究所期望的,这就需要延长随访,以便得出更可靠的结论,为临床治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Na KY, Kim HS, Park YK, et al. Multifocal renal cell carcinoma of different histological subtypes in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Korean J Pathol, 2012, 46(4): 382-386.
- [2] Su JR, Zhu DJ, Liang W, et al. Investigation on the indication of ipsilateral adrenalectomy in radical nephrectomy: a meta-analysis[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(21): 3885-3890.
- [3] 张建国, 王艳丽, 李 静, 等. 生物治疗预防肾癌根治术后复发和转移的远期疗效观察[J]. 中国医师杂志, 2005, 7(10): 1309-1311.
- [4] Lin G, Wang J, Lao X, et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells[J]. J Immunother, 2012, 35(4): 337-343.
- [5] Chen J, Huang X, Huang G, et al. Preconditioning chemotherapy with Cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(3): 210-220.
- [6] Hernberg M, Muhonen T, Turunen JP, et al. The CD4⁺/CD8⁺ ratio as a prognostic factor in patients treated with chemo-immunotherapy with metastatic melanoma[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(5): 1690-1696.
- [7] 李 莉, 宋 鑫, 叶联华. CIK 细胞免疫治疗对术后肾癌患者免疫功能的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(11): 92-96.
- [8] 王 黎, 高全立, 王子兵, 等. 自体 CIK 细胞联合化疗治疗转移性肾癌的临床疗效[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(6): 722-724.
- [9] 李 霞, 徐文滢, 崔 静, 等. CIK 细胞治疗局限性肾癌的疗效[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(8): 950-953.

(责任编辑: 冉明会)

欢迎订阅, 敬请赐稿!