

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.002

· 研究快报 ·

细胞因子诱导的杀伤细胞治疗恶性黑色素瘤临床疗效的初步分析

韩贵良^{1,2}, 刘亮^{1,2}, 于津浦², 曹水^{1,2△}, 任秀宝^{1,2} (1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 天津 300060; 2. 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060)

[摘要] **目的:**初步评价细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)在恶性黑色素瘤治疗中的效果。**方法:**收集天津医科大学附属肿瘤医院 2005 年 1 月至 2010 年 12 月术后接受 CIK 治疗的 38 例恶性黑色素瘤患者作为 CIK 治疗组,按 1:3 比例选取同期术后未接受 CIK 治疗的 114 例恶性黑色素瘤患者作为对照组,两组配对因素包括临床分期、性别、年龄、有无溃疡、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性、病理类型、KPS 评分(Karnofsky performance status scale)等均一致。随访时间为 2005 年 3 月至 2012 年 3 月,临床疗效的观察终点为总生存(overall survival, OS)期。**结果:**CIK 治疗组与对照组 1 年 OS 率分别为 86.8%、74.6% ($P=0.097$), 3 年 OS 率分别为 76.3%、46.5% ($P=0.001$), 5 年 OS 率分别为 71.1%、43.9% ($P=0.004$); CIK 治疗组中位生存期明显长于对照组(CIK 治疗组中位生存期未达到观察终点, 对照组中位生存期为 20.1 个月, $P=0.004$)。单因素和多因素分析显示,病理类型、LDH 水平是影响 CIK 治疗恶性黑色素瘤患者疗效的独立影响因素; CIK 免疫治疗的疗程数可能与黑色素瘤患者 OS 相关, CIK 疗程 >8 次具有延长黑色素瘤患者 OS 期的趋势。**结论:**CIK 免疫治疗能改善恶性黑色素瘤患者的 OS 期, 增加 CIK 疗程数可能提高其疗效。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK); 黑色素瘤; 过继性细胞免疫治疗(ACI); 临床疗效; 配对研究

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0577-05

Preliminary analysis of clinical efficacy of cytokine-induced killer cells in treatment of patients with melanoma

HAN Gui-liang^{1,2}, LIU Liang^{1,2}, YU Jin-pu², CAO Shui^{1,2*}, REN Xiu-bao^{1,2} (1. Department of Biotherapy, Tumor Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the efficacy of cytokine-induced killer cells (CIKs) in the treatment of melanoma. **Methods:** Thirty-eight post-operated melanoma patients in Tumor Hospital Affiliated to Tianjin Medical University from January 2005 to December 2010 receiving CIK treatment were obtained (CIK group) as a treatment group, and 114 melanoma patients without treatment were obtained as a control group. Pairing considerations included clinical stage, gender, age, ulceration, lactate dehydrogenase (LDH) activity, pathological type, and the Karnofsky performance status scale (KPS). The follow-up period was from March 2005 to March 2012. The endpoint of clinical efficacy was overall survival (OS). **Results:** The 1-, 3-, 5-year OS rates in the CIK and control groups were 86.8% vs 74.6% ($P=0.097$), 76.3% vs 46.5% ($P=0.001$) and 71.1% vs 43.9% ($P=0.004$), respectively. The median OS in the CIK group was significantly longer than that in the control group (the OS in CIK group did not reach median OS, and was 20.1 months in the control group, $P=0.004$). The frequency of CIK immunotherapy may be related to the OS of melanoma patients ($P=0.051$). It seemed a trend to prolong the OS of patients with melanoma when CIK treatment >8 times. Univariate and multivariate analysis showed that the pathological type and LDH activity were independent factors for the clinical efficacy of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30901376); 卫生部公益专项基金资助项目(No. 200902002-2)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30901376), and the Public Special Foundation from the Ministry of Health of China (No. 200902002-2)

[作者简介] 韩贵良(1981-), 男, 河北省保定市人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗的基础和临床研究。E-mail: guilianghan@163.com

[通信作者] 任秀宝(REN Xiu-bao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com; 曹水(CAO Shui, co-corresponding author), E-mail: caoshui@yahoo.com。△为共同通信作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20121210.1718.007.html>

CIK in treatment of patients with melanoma. **Conclusion:** CIK immunotherapy can prolong OS in melanoma patients, and increasing CIK frequency may enhance the clinical efficacy.

[**Key words**] cytokine-induced killer cell (CIK); melanoma; adoptive cellular immunotherapy (ACI); clinical efficacy; paired study

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 577-581]

恶性黑素瘤已经成为危害公共健康的重要疾病。自 20 世纪 60 年代以来, 欧洲国家的发病率以每年 3% ~ 8% 的速度递增, 我国的发病率也在逐年上升。目前, 对于早期恶性黑素瘤患者, 手术是首选的治疗手段, 中晚期患者则以放化疗为主, 但放化疗效果不佳。恶性黑素瘤具有较强的免疫原性, 因此免疫治疗一直是恶性黑素瘤治疗领域的研究热点。目前细胞免疫治疗已显示出一定的疗效, 其中, 树突状细胞疫苗对 IV 期黑素瘤患者的疗效及安全性已得到公认^[1-2]。过继性细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)是肿瘤生物治疗研究中最活跃的领域, 其通过分离自体或供体来源的免疫细胞进行体外活化和扩增, 随后输注至肿瘤患者体内发挥抗肿瘤作用^[3]。1895 年, Rosenberg 教授^[4]首次将淋巴因子诱导的杀伤细胞(lymphokine-activated killer cell, LAK)引入黑素瘤的治疗, 利用患者自身的防疫系统来治疗癌症, 开创了肿瘤过继性细胞免疫治疗的历史。之后, 肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)^[5-6]、细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)^[7]等多种免疫效应细胞相继进入临床试验。其中 CIK 细胞因具有增殖能力强、杀瘤活性高、无明显毒性反应等优点, 成为肿瘤过继性细胞免疫治疗研究的热点, 已广泛应用于肺癌^[8]、肝癌^[9]、胃癌^[10]、肾癌^[11]等多种实体肿瘤的治疗, 并证实了其有效性, 但在恶性黑素瘤中的应用尚未见报道, 本课题对其疗效进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

本研究经国家食品药品监督管理局审批(批准号为 2006L01023), 临床试验研究程序由天津医科大学附属肿瘤医院伦理委员会审查批准, 治疗前均取得患者及家属的同意并签署知情同意书。病例纳入标准为: 手术确诊为恶性黑素瘤的患者, KPS 评分 ≥ 80 分, 年龄 18 ~ 90 岁, 无心律不齐、心功能衰竭或严重冠脉疾病。孕期或哺乳期女性及伴有自身免疫疾病者排除。患者均选自 2005 年 1 月至 2010 年 12 月天津医科大学附属肿瘤医院的住院黑素瘤

患者。试验设 CIK 治疗组和对照组, CIK 治疗组包含 38 例接受 CIK 治疗的恶性黑素瘤患者, 按 1:3 比例选取同期 114 例未应用 CIK 治疗的恶性黑素瘤患者作为对照组。本研究分期采用美国肿瘤联合会分类法^[12]: I - II 期为局限期者, III 期为有区域淋巴结转移者, IV 期为有远处转移者。配对的因素主要包括临床分期、性别、年龄、有无溃疡、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性、病理类型及 KPS 评分, 两组各配对因素均衡一致, 无统计学差异。

1.2 治疗方案

对照组术后仅进行化疗或仅进行干扰素治疗, 其中化疗方案为达卡巴嗪单药(200 mg/m² 连用 5 d) 4 ~ 6 周期, 干扰素- α (9×10^6 IU/m², 每周 3 次) 6 个月至 1 年。CIK 治疗组患者术后化疗或干扰素- α 治疗的同时每月接受 1 次 CIK 回输, 患者至少接受 3 个疗程 CIK 治疗, 每次回输 CIK 数量为 $(11.57 \pm 2.45) \times 10^9$ 个。CIK 的制备、免疫表型的测定及细胞杀伤活性的检测见参考文献[13-14]。

1.3 随访及疗效评价

随访时间从 2005 年 3 月至 2012 年 3 月, 总体中位随访时间为 20.4 个月, CIK 治疗组与对照组的中位随访时间分别为 28.1 个月和 18.1 个月, 以总生存(overall survival, OS)期为观察终点。

1.4 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验和 Fisher 精确检验, 采用 Kaplan-Meier 法计算生存率, 采用 Log rank 检验比较组间生存率, 通过受试者工作特征曲线(ROC)寻找 CIK 治疗次数最佳分组点。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CIK 治疗组与对照组疗效的比较

对照组中位生存时间为 20.1 个月, CIK 治疗组中位生存时间未达到观察终点, CIK 治疗组与对照组 1 年 OS 率分别为 86.8%、74.6% ($P = 0.097$), 3 年 OS 率分别为 76.3%、46.5% ($P = 0.001$), 5 年总生存率分别为 71.1%、43.9% ($P = 0.004$)。以 OS 率为研究终点, CIK 治疗组明显优于对照组, CIK 治

疗组 3 年 OS 率较对照组提高 29.8%, 5 年 OS 率提高 27.2% (图 1)。

2.2 CIK 治疗对Ⅲ、Ⅳ期恶性黑色素瘤患者生存的影响

为了解 CIK 治疗对中晚期恶性黑色素瘤患者的疗效,对Ⅲ、Ⅳ期患者分别进行了研究,Ⅲ期患者 CIK 治疗组 4 例,对照组 12 例,其生存情况见表 1;Ⅳ期患者 CIK 治疗组 2 例,对照组 6 例,其生存情况见表 2。CIK 治疗组Ⅲ、Ⅳ期患者总生存时间较对照组均有延长趋势,CIK 治疗可能能够延长Ⅲ、Ⅳ期患者的 OS 期,但病例数较少,尚需扩大病例数进一步验证。

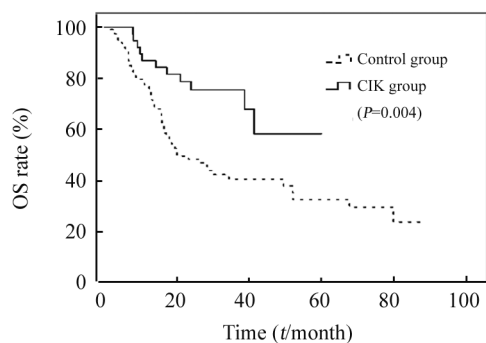


图 1 CIK 治疗组与对照组黑色素瘤患者 OS 率的比较

Fig.1 Comparison of OS rate of melanoma patients between CIK and control groups

表 1 CIK 治疗组与对照组Ⅲ期黑色素瘤患者的 OS 期分布
Tab. 1 OS distributions of stage III melanoma patients in CIK and control groups

Group	Patient No.	Pathologic type	OS (t/month)
CIK	1	Cutaneous	25
	2	Mucosal	8
	3	Mucosal	25
	4	Cutaneous	17
Control	5	Cutaneous	21
	6	Cutaneous	14
	7	Mucosal	23
	8	Mucosal	6
	9	Cutaneous	7
	10	Mucosal	17
	11	Mucosal	1
	12	Cutaneous	15
	13	Cutaneous	8
	14	Mucosal	19
	15	Mucosal	13
	16	Mucosal	19

表 2 CIK 治疗组与对照组Ⅳ期黑色素瘤患者的 OS 期分布
Tab. 2 OS distributions of stage IV melanoma patients in CIK and control groups

Group	Patient No.	Pathologic type	Metastasis loci	OS (t/month)
CIK	1	Mucosal	Liver	28
	2	Mucosal	Liver	39
Control	3	Mucosal	Liver	4
	4	Mucosal	Liver	26
	5	Mucosal	Lung	11
	6	Mucosal	Lung	18
	7	Mucosal	Brain	12
	8	Mucosal	Bone	28

2.3 影响恶性黑色素瘤患者 CIK 疗效的因素

对 CIK 治疗组 38 例恶性黑色素瘤患者 OS 进行单因素分析(表 3)后发现,病理类型、LDH 水平是影响 CIK 治疗恶性黑色素瘤患者 OS 的影响因素。多因素分析提示,病理类型、LDH 水平是影响 CIK 治疗恶性黑色素瘤患者 OS 的独立影响因素(表 4)。

2.4 CIK 治疗疗程数对恶性黑色素瘤患者生存率的影响

通过受试者工作特征曲线寻找 CIK 治疗疗程数最佳分组点,当以 8 次为分组点时,两组生存曲线有分离趋势(图 2):CIK 疗程数 ≤ 8 组,中位生存时间为 41.3 个月;CIK 疗程数 > 8 组,中位生存时间未达到。CIK 疗程数 > 8 组与 CIK 疗程数 ≤ 8 组患者 1 年 OS 率分别为 100%、80.8% (P = 0.113), 3 年 OS 率分别为 91.7%、69.2% (P = 0.129), 5 年 OS 率分别为 91.7%、61.5% (P = 0.059)。CIK 疗程数 > 8 组的恶性黑色素瘤患者 1、3、5 年 OS 率均高于 CIK 疗程数 ≤ 8 组的患者,但无统计学差异 (P > 0.05)。CIK 疗程 > 8 次可能更有利于恶性黑色素瘤患者总生存期的延长,但病例数较少,尚需扩大病例进一步验证。

3 讨论

恶性黑色素瘤已经成为危害公共健康的重要疾病,自 20 世纪 60 年代以来,在欧洲国家其发病率以每年 3%~8% 的速度递增^[15]。我国的发病率也在逐年上升,每年新发病例超过 10 000 例^[16]。目前,对于早期患者,手术仍是恶性黑色素瘤的首选治疗手段,术后辅助治疗包括黑色素瘤疫苗、低中剂量干扰素、化疗、生物

化疗、大剂量干扰素等^[17]。中晚期患者则以放化疗为主,但是,黑素瘤对化疗反应欠敏感,而细胞免疫治疗已显示出一定疗效,其中,树突状细胞疫苗对IV期患者的疗效及安全性已得到公认^[1-2]。

表 3 影响 CIK 治疗黑素瘤患者 OS 期的单因素分析
Tab. 3 Univariate analysis for variables associated with melanoma OS in CIK treatment

Factor	n	OS (t/month)	χ^2	P
Gender				
Male	25	48.0	0.896	0.344
Female	13	38.7		
Age (t/a)				
≤60	14	41.3	0.324	0.569
>60	24	48.5		
Clinical stage				
I - II	32	41.7	0.112	0.738
III - IV	6	-		
Pathologic type				
Cutaneous	20	-	3.806	0.049
Mucosal	18	41.3		
Ulceration				
Yes	14	46.6	0.304	0.582
No	24	41.3		
Chemotherapy				
Yes	23	-	0.468	0.494
No	15	39.5		
LDH				
≤ULN	36	-	34.719	0.000
>ULN	2	8		
IFN-α treatment				
Yes	14	41.3	0.148	0.700
No	24	39.8		

ULN: Upper limits of normal

表 4 影响 CIK 治疗黑素瘤患者 OS 的多因素分析
Tab. 4 Multivariate analysis for variables associated with melanoma OS in CIK treatment

Factor	n	OS (t/month)	P
LDH			
≤ULN	36	Not reached	0.000
>ULN	2	8.0	
Pathologic type			
Cutaneous	20	Not reached	0.032
Mucosal	18	41.3	

ULN: Upper limits of normal

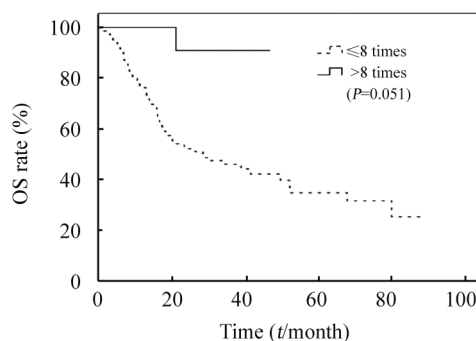


图 2 CIK 疗程数对黑素瘤患者 OS 率的影响
Fig. 2 Influence of CIK treatment frequency on OS rate melanoma patients

近年来,CIK 因其体外增殖速度快、抗肿瘤活性强、抗癌谱广、可以调节并增强机体的免疫功能等优势,临床应用日益广泛。CIK 与化放疗相结合,可提高肿瘤患者的耐受性,提高肿瘤的治疗效果。晚期肿瘤患者单纯采用 CIK 治疗,可以减小肿瘤,提高生存率,改善生活质量。Hontscha 等^[18]集中分析了 11 个 CIK 临床试验,其中试验组 426 例,对照组 867 例,病种包括肝癌、胃癌、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,结果提示试验组无病生存期(disease-free survival, DFS)明显高于对照组。而 CIK 对于恶性黑素瘤的疗效尚未见报道。本研究对 CIK 在恶性黑素瘤治疗中的应用进行了初步研究,结果提示:CIK 治疗延长了患者总生存期,提高了生存率。其机制可能有两种,一是淋巴细胞直接杀伤肿瘤细胞。Metha 等^[19]研究发现,CIK 细胞通过释放细胞溶解毒素,渗透进靶细胞,从而引起靶细胞的溶解,直接杀伤肿瘤靶细胞。二是 CIK 细胞通过分泌细胞因子增强机体的免疫功能。在培养 CIK 细胞的过程中,有研究^[20]发现 CIK 细胞活化后可以产生大量的 TNF-α、GM-CSF、IFN-γ 等炎性因子,不但对肿瘤细胞有直接的抑制作用,还通过调节机体的免疫功能间接杀伤肿瘤细胞。

本试验通过配对研究首次确认,CIK 治疗可以显著改善恶性黑素瘤患者的预后。经单因素、多因素分析发现,LDH 水平、病理类型是影响 CIK 疗效的独立影响因素。LDH 水平在正常范围、病理类型为皮肤型的患者可能更能从 CIK 治疗中获益;对于不同分期的患者,I - II 期患者可能更能从 CIK 治疗中获益,III - IV 期患者 CIK 治疗组较对照组具有生存优势,因样本量过少未行

统计学分析,尚需扩大样本量进一步研究。

通过对 38 例恶性黑色素瘤患者 CIK 治疗疗程数进行分析发现,当以 8 为分组点时,两组生存曲线有分离趋势,CIK 疗程数 > 8 组具有延长黑色素瘤患者总生存期的趋势,但无统计学差异($P = 0.051$),考虑可能因病例数较少所致,此结论与张静^[21]等对 CIK 治疗肾细胞瘤的临床疗效分析所得结论类似。

本研究为 CIK 治疗在恶性黑色素瘤领域的应用提供了证据支持,但研究例数较少,需进一步扩大研究例数,深入分析临床分期、肿瘤部位、病理类型、溃疡、年龄、性别、区域淋巴结、乳酸脱氢酶、干扰素、化疗等对 CIK 疗效的影响,从而进一步提高 CIK 治疗疗效,延长患者生存期。必要时可开展前瞻性随机对照研究,对 CIK 治疗患者的 DFS、疾病无进展生存期(progression-free survival, PFS)、生命质量(quality of life, QOL)等进行分析,从而获取 CIK 疗效更为全面的评价。

[参 考 文 献]

- [1] Redman BG, Chang AE, Whitfield J, et al. Phase Ib trial assessing autologous, tumor pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma [J]. *J Immunother*, 2008, 31(6): 591-598.
- [2] ORourke MG, Johnson MK, Lanagan CM, et al. Dendritic cell immunotherapy for stage IV melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2007, 17(5): 316-322.
- [3] Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy [J]. *Semin Oncol*, 2007, 34(6): 524-531.
- [4] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 1985, 313(23): 1485-1492.
- [5] Muul LM, Spiess PJ, Director EP, et al. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma [J]. *J Immunol*, 1987, 138(3): 989-995.
- [6] Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME et al. Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(19): 4892-4898.
- [7] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [8] Li R, Wang C, Liu L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: A phase II clinical study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11): 2125-2133.
- [9] Shi M, Zhang B, Tang Z, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(8): 1146-1151.
- [10] Jiang J, Shen Y, Wu C, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(48): 6155-6162.
- [11] Liu L, Zhang W, Qi X, et al. Randomized study of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1751-1759.
- [12] Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM, et al. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma and beyond [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1475-1477.
- [13] Li H, Wang C, Yu J, et al. Dendritic cell-activated cytokine-induced killer cells enhance the antitumor effect of chemotherapy on non-small cell lung cancer in patients after surgery [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(8): 1076-1083.
- [14] Ren X, Yu J, Liu H, et al. Th1 bias in PBMC induced by multi-cycles of auto-CIKs infusion in malignant solid tumor patients [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2006, 21(1): 22-33.
- [15] Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma [J]. *Lancet*, 2005, 365(9460): 687-701.
- [16] 郭军. 恶性黑色素瘤治疗的新进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12(12): 881-884.
- [17] 郭军主译. 黑色素瘤的预防、诊断和治疗 [M]. 2 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 1-134.
- [18] Hontscha C, Borek Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cells: First report of the international registry on CIK cells(IRCC) [J]. *J cancer*, 2011, 137(2): 305-310.
- [19] Mehta BA, Schmidt-Wolf IG, Weissman IL, et al. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3⁺ CD56⁺ killer cells [J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3493-3499.
- [20] Zoll B, Lefterova P, Csipai M, et al. Generation of cytokine induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 47(3): 221-226.
- [21] 张静, 刘亮, 于津浦, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肾细胞瘤临床疗效的评价 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 480-484.

[收稿日期] 2012 - 09 - 05

[修回日期] 2012 - 10 - 30

[本文编辑] 周玲琳