

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.001

· 专家论坛 ·

## CIK 细胞治疗癌症: 国际临床试验的现状 & 展望

王志华(1. 哈尔滨医科大学 肿瘤研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 合肥凤凰肿瘤医院 生物免疫治疗中心, 安徽 合肥 2678001)



王志华,男,研究员、主任医师,哈尔滨医科大学肿瘤研究所生物治疗研究室主任,合肥凤凰肿瘤医院副院长、生物免疫治疗中心主任;中国免疫学会生物治疗专业委员会学术委员,国家自然科学基金评议专家,国家自然科学基金及科技进步奖评审专家,教育部科技成果评审专家,黑龙江省自然科学基金评议专家,黑龙江省免疫学会肿瘤专业组主任委员;中国科学院《生物工程学报》编委,中国军事医学科学院《生物技术通讯》常务编委,《中华临床医师杂志》特邀编委,《中国医药科学杂志》特邀编委,《实用肿瘤学杂志》编委;哈尔滨医科大学优秀科研工作者,国家教育部优秀学者,国家有特殊贡献优秀中青年专家。1978 年以来一直从事肿瘤生物治疗基础及临床研究工作,曾以中国政府派出高级研究员身份在日本东京大学分子治疗学部、大阪大学分子生物与基因工程学部研修,是国家“六五”、“七五”、“八五”、“九五”和国家“863 计划”重大攻关课题的主要成员,主持国家自然科学基金和省级重点科研课题 14 项;获得国家科技进步三等奖 1 项,教育部科技进步一等奖 1 项,黑龙江省科技进步一等奖、二等奖 7 项,申报国家专利 4 项,已获得国家 CIK 细胞治疗专利 1 项;以第一作者发表中英文论文 100 余篇。E-mail:hljwzh000@163.com

[摘要] 近年来,应用细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK 细胞)进行恶性肿瘤治疗的临床试验在国内外陆续开展,CIK 细胞免疫治疗在临床治疗中表现出明显优于其他过继性免疫治疗的强大优势,因而越来越广泛地被应用到临床肿瘤治疗中。CIK 细胞可作为单独的治疗方法,也可与外科手术、放疗、化疗结合进行综合治疗。本文追踪国内外的研究进展,对 CIK 细胞的来源及表型、活化及扩增、抗肿瘤作用机制、新的技术方法及目前国际临床试验现状等诸多方面作一评述,并对目前 CIK 临床应用中存在的问题、规范化管理、质量监控、疗效评估和未来发展方向等进行探讨。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞;癌症;临床治疗试验;细胞免疫治疗

[中图分类号] R392.1; R730.51 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2013)02-0129-09

## CIK cell therapy for cancer: Current status of international clinical trials and future prospects

Wang Zhihua (1. Cancer Institute, Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Biological Immunotherapy Center, Hefei Fenghuang Cancer Hospital, Hefei 2678001, Anhui, China)

[Abstract] In recent years, the clinical trials on using cytokine induced killer (CIK) cells for solid tumor therapy have been launched worldwide. CIK cell immunotherapy has showed great advantages in clinical treatment compared with other adoptive immunity therapy, which is therefore more and more widely used in adoptive immunotherapy of tumors. CIK cells can be used alone or in combination with surgery, radiotherapy and chemotherapy for comprehensive treatment. In this article, we keep a track of research progress both home and abroad, briefly introduce the source, phenotype, activation and amplification of the CIK cells, and summarize their anti-tumor mechanisms, new techniques and methods, and current status of international clinical trials from several aspects. Some open questions about clinical treatment, standard management, quality monitoring, therapeutic evaluation and future directions are also explored.

[Key words] cytokine induced killer cell; cancer; clinical trial; cell immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 129-137]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39270765);黑龙江省自然科学基金资助项目(No. D201171)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39270765), and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. D201171)

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.001.html>

Schmidt-Wolf 等<sup>[1]</sup>于 1991 年在国际上最先报道了具有高增殖能力和高细胞毒性的细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK 细胞), CIK 细胞比 LAK 细胞、TIL 细胞具有更强大的肿瘤杀伤活性<sup>[2]</sup>。本文就近年来 CIK 细胞治疗恶性肿瘤的基础和临床研究,特别是国内外开展的临床治疗试验作重点介绍,同时结合笔者实验室的治疗情况搭建一个与同行彼此了解、共同交流的平台。

## 1 CIK 细胞的抗肿瘤机制

CIK 细胞是一种异质细胞,是一个混合的细胞群体。CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞是其主要成分,其主要的效应细胞是 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞。Negrin 等<sup>[3-4]</sup>证明,诱导扩增出来的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞来源于 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>T 细胞,而不是来源于 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>自然杀伤细胞,或体内原来就存在的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞。虽然 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞在外周血淋巴细胞中仅含 1%~5%,然而该细胞可在一定的培养条件下迅速扩增,一般情况下在体外培养 20 d 左右扩增数量可达 1 000 倍以上,而且回输体内后,在 IL-2 存在的情况下仍可进一步增殖。在 CIK 细胞的培养过程中,CD3<sup>+</sup>细胞,即 T 细胞得到了优势扩增,非 T 细胞渐被淘汰。Pievani 等<sup>[5]</sup>将培养 2 周后的单个核细胞用免疫磁珠技术纯化后,证实 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CIK 细胞占有培养细胞总数的 85%,根据上述方法获得的大量具有活性的 CIK 细胞为临床进行肿瘤免疫治疗提供了充足的数量。

目前认为 CIK 细胞的抗肿瘤作用机制可能有以下方面:(1)当 CIK 细胞被激活时,通过免疫球蛋白 Fc 受体(Fc receptor, FcR)使淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function associated antigen, LFA-1)和细胞间黏附分子(intercellular surface adhesion molecule-1, ICAM-1)的结合从低亲和力转为高亲和力,并向细胞外排出含有  $\alpha$ -氮-甲苯碳酰基-左旋-赖氨酸硫甲苯酯的毒性颗粒,引发毒性颗粒依赖性溶细胞作用,致靶细胞死亡;(2)CIK 细胞也可因表面 CD3 受体结合而激活,CD3 与 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)结合,参与信号传递,导致胞质毒性颗粒释放而产生溶瘤作用;(3)CIK 细胞自身能分泌 IL-2、IL-6、TNF 和 GM-CSF 等细胞因子,这些因子在较高浓度下可单独杀伤靶细胞或提高效应细胞的活性;(4)应用氧化酶免疫染色法检测,发现 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CIK 细胞能分泌穿孔蛋白(perforin protein, PFP),该蛋白与靶细胞溶解有关;(5)CIK 细胞也可诱导肿瘤细胞凋亡,因 CIK 细胞

能活化肿瘤细胞凋亡基因,使得 *FLIP*、*Bcl-2*、*Bcl-xL*、*DAD1* 和 *survivin* 基因表达上调<sup>[6-9]</sup>。

IL-2、IL-7、IL-15 对维持杀伤细胞的细胞毒活性起重要作用,干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)可以协同 IL-2 的细胞增殖作用,增强对 IL-2R 的刺激效应。而 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, FLT3L)和 IL-15 协同较单独应用 IL-15 能显著增加来自 CD34<sup>+</sup>细胞的 NK 细胞数量,而且可以增加 CD34<sup>+</sup>造血干细胞上 IL-2/IL-15R 的表达。最新的研究报告<sup>[10]</sup>也显示,IL-15 可有效地扩增培养的 CIK 细胞,在治疗急性髓系白血病和横纹肌肉瘤方面取得令人鼓舞的疗效。

有学者认为,CIK 细胞的杀伤机制可能是由 NK 细胞活化性受体 NKG2D 介导的细胞毒效应,即通过 CIK 细胞上的活化性受体 NKG2D 与肿瘤细胞上相应的配体 NKG2DL 相互作用,启动杀伤效应<sup>[11]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)可抑制 CIK 细胞的抗肿瘤活性,而转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ )和糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related receptor, GITR)分子在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的免疫抑制功能中具有较为重要的作用。树突状细胞(dendritic cell, DC)诱导前后,CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 含量分别为(13  $\pm$  5)%和(10  $\pm$  4)% ,证实经 DC 诱导后 CIK 细胞中的 Treg 数量减少,同时观察到 DC + CIK 细胞组 IFN- $\gamma$  和 IL-6 的分泌量高于单纯 CIK 细胞。提示 DC 可以增强 CIK 细胞的抗肿瘤活性,而其对 Treg 的影响很可能是 DC 活化 CIK 细胞的机制之一。当用特异性抗体分别封阻 TGF- $\beta$ 、IL-10、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4)和 GITR 后发现,封闭 TGF- $\beta$  和 GITR 分子可增强 CIK 细胞的增殖和杀伤活性,提示这两个分子在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 对 CIK 细胞的抑制效应中具有重要作用<sup>[12-13]</sup>。

有研究者在常规培养体系中加入 IL-15 诱导 CIK 细胞,观察到 IL-15 可增加 CIK 细胞中 NKG2D 的表达,增强 CIK 细胞的体外杀伤活性<sup>[14]</sup>。Romano 等<sup>[15]</sup>近年的研究亦证实,IL-2 和 IL-15 能够协同 DC 刺激杀伤性 T 细胞,IL-15 还能促进 T 细胞抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达,抑制 Treg 的扩增。

## 2 CIK 细胞的制备

### 2.1 不同来源 CIK 细胞的特点

CIK 细胞可以来自不同的组织,如自体或异体

的外周血、脐带血或骨髓等。临床治疗时应根据患者的实际情况选择适当的采集途径和方法,以获得最好质量的 CIK 细胞。

**2.1.1 自体来源的 CIK 细胞** 恶性肿瘤患者存在不同程度的免疫机能受损,CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞数量降低。用患者自体的 CIK 细胞经体外扩增回输安全性好,可避免由于交叉感染引发其他疾病。目前流行的“用自己的细胞治疗自己的病”的说法即指此种方法。Schmidt-Wolf 等<sup>[16]</sup>应用肿瘤患者的外周血淋巴细胞诱导 CIK 细胞,治疗期间患者血清中干扰素(interferon, IFN)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)及 TNF 水平明显增加,且患者外周血中 CD3<sup>+</sup> 细胞比例增高。

**2.1.2 同种异体来源的 CIK 细胞** 肿瘤患者都不同程度地存在免疫耐受的情况,且越是中晚期肿瘤患者免疫功能下降越严重。因此应用同种异体 CIK 细胞代替患者自身 CIK 细胞成为解决这一问题的途径之一。有两点值得注意:(1)供者细胞需来自中心血站健康献血员的同型血细胞;(2)选用采集时间和储存时间短、尽可能新鲜的血细胞。笔者课题组在临床上遇到必须用同种异体来源 CIK 细胞的时候往往采集患者直系亲属(父母、兄弟姐妹或子女)且同型血的外周血,因为他们和受者的遗传背景相对接近且血型相同,相对安全可靠,而且 CIK 细胞无论在活化还是扩增方面均比来自患者本身的 CIK 细胞明显优越。

**2.1.3 脐血来源的 CIK 细胞** 脐血来源广泛、采取方便、免疫原性弱,同时富含造血干细胞和单核细胞,而且脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞较骨髓和外周血 CD34<sup>+</sup> 细胞含量更高、更纯、增殖潜力更强。经培养后,脐血中 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞(CIK 细胞的主要效应细胞)扩增 900 倍以上,且 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞明显增加,CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞亦明显增加,这些结果都说明脐血可以培养出 CIK 细胞,且扩增潜力极强,其扩增出的 CIK 细胞杀伤活性亦高于外周血 CIK 细胞<sup>[17-20]</sup>。综合上述研究成果,可以认为来源于脐血的 CIK 细胞更适合用于临床治疗。

**2.1.4 骨髓来源的 CIK 细胞** 骨髓来源的 CIK 细胞增殖能力较外周血来源的 CIK 细胞稍差,但在细胞毒方面与外周血 CIK 细胞相比无显著性差异。Linn 等<sup>[21]</sup>从急性粒细胞白血病患者采集的骨髓样本中诱导 CIK 细胞,获得的 CIK 细胞在活化、扩增及杀伤靶细胞方面没有大的差别。

综上,前面提及的 4 种方式都可作为 CIK 细胞

前体细胞来源进行采集和培养,治疗前应根据实验室的具体情况、培养经验,特别应根据受治患者和家属的意愿选择适当的采集方式。

**2.2 其他细胞、细胞因子及抗体在 CIK 细胞培养中的作用**

**2.2.1 DC 的作用** 很多实验室采用 DC 和 CIK 细胞共培养以提高治疗效果:(1)DC 是一种较强的抗原提呈细胞,可以将抗原信息提呈给 T 细胞,能显著增强 CIK 细胞活性<sup>[22]</sup>;(2)DC 与 CIK 细胞混合培养 24 h 后,IL-12 的分泌量为 CIK 细胞单独培养时的 6.93 倍;(3)DC 的抗原提呈作用能使 CIK 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的时间延长,分泌量增加,是单纯 CIK 细胞培养的 3~5 倍,且两种细胞上清液中 IL-12、IFN- $\gamma$  分泌量均增加;(4)上调 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞,下调 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞;(5)肿瘤相关抗原明显下降,患者生活质量显著提高;(6)杀伤肿瘤效率高于单纯 CIK 细胞治疗组,且无明显毒性作用<sup>[23-24]</sup>。近两年,以加拿大学者斯坦曼获得诺贝尔医学奖为契机,国内外以 DC 治疗肿瘤的临床研究竞相开展<sup>[25-26]</sup>,可以预言,将 DC 和 CIK 细胞共培养并进行联合治疗将会普遍推广。

**2.2.2 细胞因子的作用** 已有研究<sup>[27-28]</sup>均显示,IL-2、IL-7、IL-15 对维持 CIK 细胞的细胞毒活性起重要作用。研究<sup>[29]</sup>证明,IL-15 可有效地扩增培养的 CIK 细胞,在治疗急性髓系白血病和横纹肌肉瘤方面取得了令人鼓舞的效果。

联合 IL-12 与 IL-2 则可以扩增较高比例的 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> CIK 细胞,而且 CIK 细胞总数也有显著增高,这说明 IL-12 同 IL-2 一样可以诱导 CIK 细胞的增殖,且两者有协同作用。另外,用 IL-2 和 IL-12 共同活化 CIK 细胞时可适当减少各自的剂量,亦可减少相应的毒性作用<sup>[30]</sup>。在诱导 CIK 细胞过程中加入 IL-24 可促进 CIK 细胞的增殖,且可明显增加 CIK 细胞的杀伤活性,对肿瘤细胞的杀伤率达到 90% 以上。其机制可能与 IL-24 对肿瘤细胞具有杀伤力,而且 IL-24 刺激的外周血单个核细胞 48 h 后有 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的高表达,同时 IL-1 $\beta$ 、IL-12 和 GM-CSF 也有一定水平的表达有关<sup>[31-32]</sup>。

**2.2.3 胸腺球蛋白的作用** 胸腺球蛋白(Thymoglobulin<sup>®</sup>, TG)是一种通过兔抗人胸腺细胞而获得的 IgG 多克隆抗体,一般认为胸腺球蛋白可以取代 CD3 单克隆抗体和 IFN、IL-2 结合,达到更有效地扩增 CIK 细胞的目的。研究者<sup>[33]</sup>评估了用胸腺球蛋白活化的 CIK 细胞杀伤靶细胞的能力,证明该细胞可更有效地杀伤 K562 肿瘤细胞,并能产生大量的

具有生物活性的 IL-12 p40。

### 2.3 基因工程技术对 CIK 细胞的修饰作用

CIK 细胞输注在 I 期临床试验中已对白血病、淋巴瘤和多种实体瘤进行了治疗, CIK 细胞疗法毒性较低, 然而治疗效果也有限, 要想达到清除肿瘤的目的则需要获得大量的 CIK 细胞。国外学者 Marin 等<sup>[34]</sup>将编码抗 CD33-C 和抗 CD33-CCD28-OX40-C 受体基因的 SFC 逆转录病毒载体导入 CIK 细胞, 结果显示转基因细胞极大地改善了抗白血病活性, 对不同来源的急性髓性白血病细胞的杀伤活性提高到 80%, 并可释放高水平的细胞因子。

### 2.4 CIK 细胞的制备及其质量控制

**2.4.1 CIK 细胞制备的基本方法** 临床治疗前应根据患者的实际情况选择合适的细胞来源及采集方法, 以获得较多数量的高活性细胞。各实验室 CIK 细胞的制备方法各异, 所用材料也不尽相同, 但大致步骤相似: (1) 采集患者自体外周血或供者外周血单个核细胞; (2) 淋巴细胞分离液分离单个核细胞; (3) 加入培养液, 调节细胞密度; (4) 加入已包被 CD3 单克隆抗体 (100 ng/ml) 的细胞瓶内, 再加入 INF- $\gamma$ , 培养 24 h; (5) 加入 IL-1 $\alpha$ , 补加 IL-2; (6) 每 2~3 d 传代扩增一次, 同时补充 IL-2 和 INF- $\gamma$ 。视细胞生长状态, 2~3 周后做微生物检测 (细菌、真菌、支原体等); 流式细胞仪检测细胞表型, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞应占绝大多数; 核素释放实验检测细胞的杀伤活性; 收集细胞、染色、镜检、计数 (每次收集细胞数应  $\geq 2 \times 10^9$ , 存活率应  $\geq 95\%$ ); 尼龙膜过滤、回输。

**2.4.2 CIK 细胞的质控标准** (1) 得率和存活力: 为了保证治疗质量, 每次收集细胞数应  $\geq 2 \times 10^9$ , 活率应  $\geq 95\%$ ; (2) 纯度、均一性或特征性表面标志: CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞应占大多数; (3) 生物效应: 可通过 MTT 实验或核素释放实验检测杀伤活性; (4) 外源性因子的检测: 细菌、真菌、支原体、病毒、内毒素, 采用微生物快速检测系统做微生物检测; (5) 其他添加成分的检测, 如牛血清白蛋白、抗体、血清、抗生素、固相微粒等; (6) 稳定性检验。

为保证质量, 降低风险、提高疗效, 应特别注意的是: (1) 操作必须在国家技术监督部门批准并验收的 GMP 环境中进行; (2) 自体 CIK 细胞治疗严格掌握适应症, 合理避开放化疗时间; (3) 严格掌握几种细胞因子用量; (4) 培养基可为 RPMI 1640、DMEM、无血清培养基 GT-T551; (5) CD3 单克隆抗体亦可不提前包被, 直接加入; (6) 确保收获细胞的数量和质量; (7) 输注前后以 0.9% NaCl 液 50 ml 疏通血管, 防止微血管栓塞; (8) 培养基如使用 RPMI

1640、DMEM 则需要添加患者血浆或人 AB 型血清 (模拟体内细胞生长环境), 成本相对低的培养基其扩增效果较差, 故最好使用 GT-T551 无血清培养基 (日本 TaKaRa 公司系列产品)。

CIK 细胞培养的质和量是保证治疗成败的关键因素, 换句话说, 首先要保证细胞无病原微生物污染, 其次确认培养的细胞绝大多数是 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> CIK 细胞, 且每次输入应确保较高的细胞数量, 其原因是肿瘤细胞通常体积较大, 而 CIK 细胞相对较小, 在对靶细胞的杀伤过程中往往需要多个 CIK 细胞才能围歼一个癌细胞。为此要灵活掌控回输时机与每次的间隔时间, 制定个体化治疗方案。另外, 对肿瘤较大或多发转移的中晚期患者要尽量多做几个疗程, 采取序贯疗法或 DC 疫苗、DC/CIK 细胞等以增加疗效。笔者治疗中心将细胞生长和质控检测所摄图片发至临床治疗科室, 作为患者临床资料放在患者的病案中, 便于临床医生和患者监督。

## 3 CIK 细胞的临床应用及疗效评价

### 3.1 CIK 细胞临床应用的有关问题

**3.1.1 治疗中确保 CIK 细胞的数量和质量** 卫生部“人体细胞治疗临床研究质控要点”和中国免疫学会制定的“过继性免疫治疗癌症规范”规定每例患者需平均治疗 2 个疗程, 每疗程回输细胞总数应不少于  $5 \times 10^9$  个。为提高治疗效果, 笔者治疗中心实行更为严格的质控标准: 输入前 3 d 必须对 CIK 细胞进行细菌、真菌、LPS 和支原体检测, 进行细胞表型测定、MTT 实验或 <sup>51</sup>Cr 放射性体外杀伤活性测定; 活细胞必须占到全部培养细胞的 99% 以上, 每次输入细胞数量达到或超过  $2 \times 10^9$  个, 每疗程达到或超过  $1 \times 10^{10} \sim 1.5 \times 10^{10}$  个, 连续治疗应在 3 个疗程以上, 以此确保治疗的安全性及有效性。

**3.1.2 CIK 细胞治疗患者的选择** 并非所有肿瘤患者都适合做 CIK 细胞治疗。在 CIK 细胞治疗过程中, 选取哪一种治疗方式需讲究针对性、科学性, 综合患者的意愿和知情同意, 以及患者体质、肿瘤生长转移情况和免疫状态。具体取决于以下几个方面: (1) 免疫状态 (患者年龄、体质、精神压力、营养、其他疾病等); (2) 肿瘤临床分期与病灶情况 (肿瘤大小、转移情况等); (3) 个体生活习惯差异 (饮食、睡眠、工作、运动等); (4) 已接受或计划接受的癌症治疗方法 (手术、放化疗等); (5) 阶段性疗效评估 (血象与影像学报告等); (6) 经济能力 (有否医保、报销及报销比例); (7) 患者与家属对治疗目标的期望与共识。

**3.1.3 CIK 细胞治疗的适应症** CIK 细胞适合于

治疗肺癌、乳癌、肠癌、头颈部肿瘤、妇科肿瘤等各种肿瘤患者;癌性胸、腹水患者;对恶性黑色素瘤、白血病、肾癌、非霍奇金淋巴瘤等效果更佳(T 淋巴瘤除外);对肿瘤手术、化疗、放疗结束后的巩固治疗;或作为肿瘤综合治疗的组成部分,如在化疗的间隙期或在肿瘤局部放疗过程中联合应用;晚期肿瘤患者的辅助治疗,在接受治疗前应尽量降低肿瘤负荷。

**3.1.4 CIK 细胞治疗的禁忌症** CIK 细胞治疗的禁忌症包括:(1)严重的自身免疫性疾病;(2)T 淋巴瘤;(3)细胞因子过敏症;(4)哺乳期及妊娠期;(5)严重感染性疾病;(6)器官功能衰竭;(7)脏器移植者。在向患者及家属介绍 CIK 细胞治疗的详细情况和可能出现的副作用、治疗风险,并得到认可后,签署知情同意书并制定治疗方案。

**3.1.5 CIK 细胞治疗效果的评估** CIK 细胞临床治疗可采取单纯 CIK 细胞治疗或 CIK 细胞联合其他治疗方法(DC、手术、放疗、化疗、中草药等),应随机选取或采用两两对照,设置严格的对照组。评估时间点:CIK 细胞治疗前一次,治疗后 1、3、6 个月和 1 年评估一次,以后每年复查一次。

近期临床疗效观察包括:(1)DTH 反应:阴性或者阳性(如有肿瘤抗原时);肿瘤特异性 CTL 检测;(2)细胞因子:血液中 IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  等的增加或减少;(3)细胞亚群测定:NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、CTL、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞及细胞比值变化;(4)生活质量(quality of life, QOL):采用 Karnofsky 评分标准,提高 20 分以上为显效(complete response, CR);提高 10~20 分为有效(partial response, PR);提高 10 分以下至下降 10 分以内为稳定(stable disease, SD);下降 10 分以上为进展(progressive disease, PD);(5)血清学肿瘤标志物测定:CEA、CA 系列等;(6)输注前后影像学变化:CT、MRI、彩超等;(7)胸腹水的增加或减少。

远期临床疗效观察包括:(1)观察肿瘤抑制、肿瘤体积缩小,长期带瘤生存情况(参考 WHO 肿瘤疗效评估标准)。可用无进展生存期(progression-free survival, PFS)、无病生存期(disease-free survival, DFS)、总缓解率(overall response rate, OR)、总生存时间(overall survival time, OS)或疾病控制率(disease control rate, DCR)表示。(2)生活质量同近期疗效观察(采用 Karnofsky 评分)。

### 3.2 CIK 细胞抗肿瘤临床试验

CIK 细胞具有如下重要的功能特性:(1)较高的体外扩增能力;(2)较低的同种异体反应性;(3)较好的识别靶细胞的能力,即能与肿瘤相关抗原

(tumor-associated antigen, TAA)结合;(4)MHC 非限制性肿瘤杀伤。Martiro 等<sup>[35]</sup>应用 CIK 细胞对 11 例患者(其中急性髓性白血病 1 例,霍奇金病 3 例,慢性髓性白血病 1 例,前 B 淋巴母细胞性白血病 1 例,脊髓发育不良患者 2 例,再生障碍性贫血 2 例,血友病 1 例)进行配对试验治疗,结果表明,患者对 CIK 细胞回输具有很好的耐受,没有发生急性或慢性不良反应,其中 1 例病情稳定、1 例造血功能改善、3 例疗效显著。目前 CIK 细胞对血液系统恶性肿瘤治疗的报道较多,疗效也得到了较为普遍的认可<sup>[36-39]</sup>。

德国 Humboldt 大学的 Schmidt-Wolf 等<sup>[17]</sup>对 10 例分别罹患肾癌、结直肠癌、淋巴瘤的晚期肿瘤患者应用 IL-2 基因转染的 CIK 细胞治疗,治疗后其中 3 例患者肿瘤呈现静息状态,1 例淋巴瘤患者获得缓解。另有研究者<sup>[40]</sup>报道了应用 CIK 细胞治疗 63 例肿瘤患者(其中肝癌 15 例、胃癌 14 例、食管癌 11 例、肺癌 6 例、乳腺癌 5 例、其他肿瘤 12 例,肿瘤分期为 II~IV 期)的近期疗效,结果显示 CIK 细胞对实体瘤疗效显著,无毒副作用。前面提到的胸腺球蛋白活化的 CIK 细胞治疗了 5 位放化疗失败的成年肿瘤患者,使这几名患者的平均生存期达到了 4.5 个月<sup>[44]</sup>。其他有关的临床试验报道亦对 CIK 细胞治疗实体瘤的有效性给予证实和肯定<sup>[26,42-46]</sup>。还有报告<sup>[47-48]</sup>称,CIK 细胞能增强化疗的作用,无论对原发肿瘤或转移肿瘤都有较明显的疗效。有学者<sup>[46]</sup>通过中国科技期刊数据库检索收集了国内 24 个临床试验报告,其中 CIK 细胞培养时间为 7~28 d,总的细胞输入数量为  $1 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^{10}$ ;563 例患者中,疗效显著的 40 例,部分恢复的 126 例,微弱反应的 125 例,病情稳定的 135 例,无反应的 76 例,病情进展的 58 例,总有效率为 51.7%(291/563)。

2010 年,国际上出现了一个网站(international registry on CIK cell, IRCC),宗旨是搜集世界上所有有关 CIK 细胞治疗肿瘤的临床信息,建立统一的治疗标准和观察指标,进行信息传递和疗效评估。2011 年该网站发布了第一批 CIK 细胞治疗肿瘤患者资料,在总共 867 例患者参与的 11 个临床试验中,接受 CIK 细胞治疗的 426 例患者大多数为肝癌、胃癌、霍奇金或非霍奇金淋巴瘤;11 个试验中的 10 个采用自体 CIK 细胞,每次回输细胞量  $7.2 \times 10^6$  至  $2.1 \times 10^{10}$  个,总输入量为  $21.9 \times 10^7$  至  $5.2 \times 10^{10}$  个;得到评价的 384 例患者中,疗效显著的 24 例,部分恢复的 27 例,微弱反应的 40 例,总反应率是 91/384;病情稳定的 161 例,病情进展的 129 例,

肿瘤缩小的3例,副作用轻微,无进展生存率较对照组明显提高<sup>[49]</sup>。Sangiolo<sup>[50]</sup>在一篇综述中归纳了国际上多家单位的临床试验治疗数据,对患者的选择、

病种、治疗情况、疗效和安全性都做了认真总结,有助于读者了解当今国际上的临床试验情况(表1)。

表1 CIK细胞过继免疫治疗实体瘤的临床试验总结

肿瘤种类	治疗例数	CIK细胞来源	不良反应	临床疗效
肠癌,肾癌	10	自体	发热(3例)	CR(1例),SD(3例)
非霍奇金淋巴瘤	12	自体	发热(2例)	CR(3例),SD(2例)
肾癌,肝癌,进展性 非小细胞肺癌	59(随机)	自体+化疗	无	PFS和OS提高
手术后非小细胞 肺癌(辅助治疗)	127(随机)	自体	发热(5例)	DFS提高
肝癌(辅助治疗)	85(随机)	自体	无	减少复发率
胃癌(IV期)	57(随机)	自体+化疗	无	肿瘤标志物降低,QOL提高
肝癌	13	自体	一过性发热	瘤体缩小(3例),症状改善, HEV-DNA减少
多种肿瘤(非小细胞 肺癌,胃癌,肠癌)	40(随机)	同种异体	无	PFS和OS提高
胃癌	156(随机)	自体+化疗	无	生存期提高

笔者所在治疗中心自承担国家重点攻关和“863”课题以来,先后用LAK、TIL、NK、A-NK细胞、干细胞移植、DC、CIK细胞等方法治疗肿瘤患者数千例,因篇幅所限,仅举2例。典型病例1:于XX,女,55岁,1996年3月结肠癌外科切除术后肺转移,病理:浸润溃疡性中分化结肠腺癌,因身体衰弱无法进行化疗,先行A-NK细胞加IL-2治疗,后改用CIK细胞联合IL-2(30万IU/次)、IL-12(1000IU/次)治疗,前后共治疗10余个疗程,输入细胞总数 $>1.2 \times 10^{11}$ 个,患者生存质量明显提高(Karnofsky $>20$ ),带瘤生存13年,后因脑转移死于呼吸衰竭。典型病例2:郝XX,女,54岁,左肺占位,逐渐增大,2008年行患病肺叶切除术,病理:左肺腺癌伴部分肺泡癌变,术后不久发现右肺出现转移灶,化疗4个疗程;用CIK细胞加IL-2(30万IU/次)、IL-12(1000IU/次)治疗,前后共治疗7个疗程,输入细胞总数 $>7 \times 10^{10}$ 个,带瘤生存5年,目前各项检查指标正常,生存质量明显提高(Karnofsky $>20$ ),现仍正常工作。

关于肿瘤CIK细胞治疗疗效问题各家报道不一,究其原因如下:(1)各医疗单位所用材料、方法不一致。(2)大多缺少随机分组和对照研究。(3)培养时间不足,据了解国内有的单位回输细胞仅仅培养2~3d,回输2~3次,实际上在这么短的时间里细胞从体内到体外培养只能是适应环境的过程,

根本没有达到真正意义上的扩增。(4)回输细胞数量不足,也就是效靶比例的问题。顾名思义,实体瘤不是单个细胞,而是拥有一定体积的细胞团块,不仅有效靶比例,还有空间障碍或细胞屏障的问题。对于实体瘤来说杀伤应该是由外到内,由表及里进行的,这也是为什么很多体外实验设计的效靶比例是10:1~100:1,数量对比中很可能是数个CIK细胞攻击一个肿瘤细胞,这就要求每次输入的CIK细胞质量足够好,数量够用,输入的次数足够多,否则杯水车薪,不可能达到预想的结果。以IRCC披露的CIK细胞治疗的426例患者为例,患者的免疫细胞总回输量为 $21.9 \times 10^7$ 至 $5.2 \times 10^{10}$ ,高低之间竟然相差了200多倍,治疗的结果显然也会有所差异。

其次,在临床试验中也有患者选择的问题。除严格遵照CIK细胞治疗的适应症、禁忌症外,估价患者的预期生存期应不少于3个月,还应尽可能选择术后或肿瘤负荷较少的患者(一定要设立相应的患者作为对照组,包括性别、年龄、肿瘤大小、临床分期、病理分型、治疗经历等)作为实验对象,以便在治疗后有足够的时间观察和随访,防止中途减员影响统计学处理结果。以后逐步扩大样本数量,由浅入深,由易而难,包括吸收难治性肿瘤患者参与,如此较易得出客观、全面的结论。

再次,很多人,包括临床医生,对 CIK 细胞治疗认知度不够,知其然不知所以然,一味地盯在三大经典治疗上,往往患者病入膏肓时才想起生物治疗,以至于错过最佳治疗时机。诚然,CIK 细胞治疗效果相对来得较慢,短期内(1 或 2 个疗程)确实很难有明显效果。另外,还有一个财力问题。目前在国内一个疗程收费因地区不同多在 2~4 万之间,国外甚至更多。一般患者在进行经典三大治疗后经济上已经捉襟见肘,而国内医保的地区间差异较大,有的地方或不予报销或报销比例偏低,因此很多患者在高收费面前或望而却步,或浅尝即止。以上问题或许成为瓶颈限制了 CIK 细胞治疗的普及和发展。

CIK 细胞输注在 I 期临床试验中已经用于白血病、淋巴瘤和各种实体瘤,然而治疗效果有限,特别对于瘤体较大的患者,要想取得成功并达到清除肿瘤的目的则需要大量的 CIK 细胞或改变以往的治疗模式。在治疗时间的设计上,国内多采取每日或隔日输入的方式,国外则多采取每周或隔周的方式,日本实验室在培养中多加入纤维蛋白原片段和(或)增强子(enhancer)<sup>[51]</sup>,用于提高 CIK 细胞的纯度,保证细胞的质和量;亦可增加科技创新,Sheen 等<sup>[52]</sup>尝试将患者的 T 细胞导入抗 CEA 受体抗体,成功地诱发 T 细胞活化以对抗自体肿瘤细胞;与此相关的研究将 CD28 和 CD3 $\zeta$  信号域(signaling domain)基因重组的 BW431/26-scFv-Fc-CD28- $\zeta$  受体导入 T 细胞,或将肿瘤抗原、T 细胞受体、配体,或单克隆抗体等通过基因工程的方式转导给 CIK 细胞,加强对肿瘤靶细胞的结合力,增强特异性,消解肿瘤细胞的免疫耐受<sup>[38, 53-57]</sup>。

从上述引用的大量临床试验治疗数据来看,CIK 细胞治疗是安全的,CIK 细胞临床应用时的不良反应主要包括:轻度发热、畏寒等,偶见关节痛、腹痛等,一般表现为类感冒症状。一般来说,发热的患者占总体治疗人数的 3%~30%,笔者研究小组在治疗中的发热患者比例尚不足 1%,应该说严格的管理和质控以及细致的操作必不可少<sup>[58]</sup>。

#### 4 问题与展望

近年来,应用 CIK 细胞进行实体瘤治疗的临床试验在国内外陆续开展。国际上,美国加利福尼亚州斯坦福大学 Schmidt-Wolf 首先报道了 CIK 细胞治疗方法,其他欧洲国家,如英国、意大利、法国、德国等,亚洲如日本、韩国、新加坡、印度以及澳洲的澳大利亚等国家都相继发表基础研究和临床试验报告,然而和国际相比,目前开展最多、论文发表最多的国家当属中国。

国内 CIK 细胞治疗工作开展较早的城市如北京、上海、天津、哈尔滨、广州、深圳(笔者课题组 1995 年创建了深圳市首个生物治疗中心,批准号:深卫医发 1995 第 42 号)等都有大量的基础及临床应用的报道,目前国内已经开展或酝酿开展的单位已超过 300 个。中西方之间何以出现这么大的差异,即为什么 CIK 细胞治疗在国内非常流行,而国际尚不十分流行呢?试分析原因如下:(1)首先这得益于国家政策,卫生部将 CIK 细胞治疗列入可以开展的第三类临床技术;(2)其次中国人口基数大,肿瘤发病率高;(3)除公立医院外,部分军队院校、部队医院也相继对社会开放;(4)医疗市场化使得国际资本和部分国内公司、投资人等也竞相转入开发行列;(5)有的单位在没有任何基础研究,甚至在缺乏基本理论和实践的情况下,受利益驱使,一蹴而就,直接过渡到临床治疗;(6)医疗管理部门监管缺失或不到位。尚有其他技术层面的问题,如很多临床研究未进行有效注册,部分临床研究缺乏学术论证和高质量的临床试验方案,导致无法获得令人信服的临床数据或解决一些具体的临床实际问题。

面对上述问题,笔者认为今后应在以下方面进一步思考和探索,并付诸努力:(1)强化医疗行政和监管部门的责任和义务,建立 CIK 细胞治疗的注册、申报、审批、准入、监管及定期检查制度;(2)建立 CIK 细胞过继免疫治疗的统一方案和质量保证体系,从细胞采集、培养、回输数量、回输途径、每次回输间隔时间、疗程之间的间隔期乃至随访和疗效判定(免疫学指标、肿瘤标志物、生活质量评分及临床指标评估)都应该实行规范化操作与管理;(3)对个别患者也可建立个体化治疗方案,加强针对性及有效性,提高和保证临床试验的整体质量;(4)精心设计、精心管理、精心治疗,按照 CIK 细胞治疗适应症和禁忌症选择患者,设立严格的对照,努力取得令人信服的临床证据;(5)注重 CIK 细胞和 DC 共培养来加强抗原提呈,加强和经典疗法结合的综和治理,事实证明 CIK 细胞可增强手术效果、降低放疗的毒性作用;(6)对中晚期患者亦可单纯做 CIK 细胞治疗,尽可能扩大治疗样本,更多地让事实说话;(7)加强基础研究,揉入新的治疗元素,如寻找细胞因子联合应用的最好组合,结合单抗技术或转基因和细胞修饰等,以加强 CIK 细胞识别靶细胞的特异性和对肿瘤细胞的攻击性,进一步提升治疗效果。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 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.
- [2] Finke S, Trojaneck B, Lefterova P, et al. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(1): 31-39.
- [3] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Johnston V. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers [J]. *Br J Haematol*, 1994, 87(3): 453-458.
- [4] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *Immunol*, 1994, 153(4): 1687-1696.
- [5] Pievani A, Borleri G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity [J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3301-3310.
- [6] Verneris MR, Kornacker M, Mailander V, et al. Resistance of *ex vivo* expanded CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> T cells to Fas-mediated apoptosis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 49(6): 335-345.
- [7] Grizapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, et al. Large-scale expansion of CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(8): 440-448.
- [8] Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, et al. Expansion of cytotoxic CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(4): 216-222.
- [9] Ortaldo JR, Winkler-Pickett RT, Yagita H, et al. Comparative studies CD3<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells: Examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression [J]. *Cell Immunol*, 1991, 136(2): 486-495.
- [10] Thanendrarajan S, Nowak M, Abken H, et al. Combining cytokine-induced killer cells with vaccination in cancer immunotherapy: More than one plus one? [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(9): 1136-1142.
- [11] 李晓峰, 孙伟芬, 黄苹, 等. IL-15 对 CIK 细胞的 NKG2D 表达及杀伤活性的影响 [J]. *中国医药指南*, 2010, 8(17): 5-7.
- [12] Li H, Yu JP, Cao S, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients [J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27(3): 317-326.
- [13] 李慧, 任秀宝, 张澎, 等. 树突状细胞对 CIK 细胞中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞数量的免疫调节作用的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 44(5): 3134-3138.
- [14] Mei JZ, Liu GJ, Li RJ, et al. Enhancement of cytotoxicity against IL-15 up-regulate NKG2D expression on cytokine-induced killer cells [J]. *J Practical Oncology*, 2011, 25(5): 14-16.
- [15] Romano E, Rossi M, Ratzinger G. Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL-15 secretion and T-cell activation *in vitro*, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1984-1997.
- [16] Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma [J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(2): 1009-1016.
- [17] Cohen SB, Woolley J, Bogunia-Kubik K, et al. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) within cord blood sera may be partially responsible for the reduced proliferation of cord blood T cell [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2000, 11(4): 608-617.
- [18] Robinson KL, Ayello J, Hughes R, et al. *Ex vivo* expansion, maturation, and activation of umbilical cord blood-derived T lymphocytes with IL-2, IL-12, anti-CD3, and IL-7. Potential for adoptive cellular immunotherapy post-umbilical cord blood transplantation [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(3): 245-251.
- [19] Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant [J]. *Transfus Clin Biol*, 2001, 8(3): 146-154.
- [20] Ende N, Lu S, Alcidi MG, et al. Pooled umbilical cord blood as a possible universal donor for marrow reconstitution and use in nuclear accidents [J]. *Life Sci*, 2001, 69(13): 1531-1539.
- [21] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9): 1457-1462.
- [22] Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: Emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(1): 24-34.
- [23] Schmidt J, Eisold S, Buchler MW, et al. Dendritic cells reduce number and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunther*, 2004, 53(11): 1018-1026.
- [24] 陈虎, 唐晓义, 张斌. 树突状细胞肿瘤疫苗: 全球临床试验巡礼 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(1): 1-10.
- [25] Oshita C, Takikawa M, Kume A, et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4): 1131-1138.
- [26] 黄孙卉, 张崇友, 王志华. DC 与 CIK 细胞共培养在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2011, 25(1): 14-17.
- [27] Miller JS, Tessmer-Tuck J, Blake N, et al. Endogenous IL-2 production by natural killer cells maintains cytotoxic and proliferative capacity following retroviral-mediated gene transfer [J]. *Exp Hematol*, 1997, 25(11): 1140-1148.
- [28] Mingari MC, Vitale C, Cantoni C, et al. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursor: Selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I specific inhibitory receptor [J]. *Eur Immunol*, 1997, 27(6): 1374-1380.
- [29] Rettinger E, Meyer V, Kreyenberg H, et al. Cytotoxic capacity of IL-15-stimulated cytokine-induced killer cells against human acute myeloid leukemia and rhabdomyosarcoma in humanized preclinical

- mouse models [ J ]. *Front Oncol*, 2012, 2: 32.
- [ 30 ] Qin L, Wang ZH, Yuan YT. Effects of IL-12 on cytokine-induced killer cells [ J ]. *Int J Immunol*, 2007, 30( 4 ): 203-207.
- [ 31 ] Yuan YT, Wang ZH, Qin L. Effects of IL-24 on cytokine-induced killer cells [ J ]. *World China J Digestol*, 2007, 15( 6 ): 548-553.
- [ 32 ] Jalah R, Patel V, Kulkarni V, et al. IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques [ J ]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8( 11 ): 1620-1629.
- [ 33 ] Bonanno G, Iudicone P, Mariotti A, et al. Thymoglobulin, interferon-g and interleukin-2 efficiently expand cytokine-induced killer ( CIK ) cells in clinical-grade cultures [ J ]. *J Transl Med*, 2010, 8: 129
- [ 34 ] Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, et al. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: Improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors [ J ]. *Haematologica*, 2010, 95( 12 ): 2144-2152
- [ 35 ] Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: A phase I study [ J ]. *Haematologica*, 2007, 92( 67 ): 952-959.
- [ 36 ] Yang B, Lu XC, Yu RL, et al. Repeated transfusions of autologous cytokine-induced killer cells for treatment of haematological malignancies in elderly patients: A pilot clinical trial [ J ]. *Hematol Oncol*, 2012, 30( 3 ): 115-122.
- [ 37 ] Oliosio P, Giancola R, Di Riti M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: A pilot clinical trial [ J ]. *Hematol Oncol*, 2009, 27( 3 ): 130-139.
- [ 38 ] Martin PJ. CIK: A path to GVL without GVHD? [ J ]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17( 11 ): 1571-1572.
- [ 39 ] Niam M, Linn YC, Fook Chong S, et al. Clinical scale expansion of cytokine-induced killer cells is feasible from healthy donors and patients with acute and chronic myeloid leukemia at various stages of therapy [ J ]. *Exp Hematol*, 2011, 39( 9 ): 897-903.
- [ 40 ] 陈复兴, 刘军权, 张南征, 等. 自身细胞因子诱导的杀伤细胞过继性免疫治疗恶性肿瘤的临床观察 [ J ]. *癌症*, 2002, 21( 7 ): 797-801.
- [ 41 ] Rutella S, Iudicone P, Bonanno G, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells generated with a new good manufacturing practice-grade protocol [ J ]. *Cytotherapy*, 2012, 14( 7 ): 841-850.
- [ 42 ] Pan CC, Huang ZL, Li W, et al. Serum alpha-fetoprotein measurement in predicting clinical outcome related to autologous cytokine-induced killer cells in patients with hepatocellular carcinoma undergone minimally invasive therapy [ J ]. *Chin J Cancer*, 2010, 29( 6 ): 596-602.
- [ 43 ] Li XD, Xu B, Wu J, et al. Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies [ J ]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14( 2 ): 102-108.
- [ 44 ] Jiang JT, Shen YP, Wu CP, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients [ J ]. *World Gastroenterol J*, 2010, 16( 48 ): 6155-6162.
- [ 45 ] Zhang J, Zhu L, Wei J, et al. The effects of cytokine-induced killer cells for the treatment of patients with solid tumors: A clinical retrospective study [ J ]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138( 6 ): 1057-1062.
- [ 46 ] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [ J ]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [ 47 ] Niu Q, Wang W, Li Y, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies [ J ]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11( 4 ): 449-456.
- [ 48 ] Li JJ, Gu MF, Pan K, et al. Autologous cytokine-induced killer cell transfusion in combination with gemcitabine plus cisplatin regimen chemotherapy for metastatic nasopharyngeal carcinoma [ J ]. *J Immunother*, 2012, 35( 2 ): 189-195.
- [ 49 ] 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.
- [ 50 ] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [ J ]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [ 51 ] 任玮, 王志华. 重组人纤维蛋白酶片段诱导 CIK 的增殖及对肺癌耐顺铂细胞的杀伤作用 [ J ]. *生物工程学报*, 2008, 24( 8 ): 1373-1380.
- [ 52 ] Sheen AJ, Irlam J, Kirillova N, et al. Gene therapy of patient-derived T lymphocytes to target and eradicate colorectal hepatic metastases [ J ]. *Diseases Colon Rectum*, 2003, 46( 6 ): 793-804.
- [ 53 ] Yoon SH, Lee JM, Woo SJ, et al. Transfer of Her-2/neu specificity into cytokine-induced killer ( CIK ) cells with RNA encoding chimeric immune receptor ( CIR ) [ J ]. *J Clin Immunol*, 2009, 29( 6 ): 806-814.
- [ 54 ] Pievani A, Belussi C, Klein C, et al. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell ( CIK ) cultures and anti-CD20 antibodies [ J ]. *Blood*, 2011, 117( 2 ): 510-518.
- [ 55 ] Pizzitola I, Agostoni V, Cribioli E, et al. *In vitro* comparison of three different chimeric receptor-modified effector T-cell populations for leukemia cell therapy [ J ]. *J Immunother*, 2011, 34( 6 ): 469-479.
- [ 56 ] Hombach A, Schlimper C, Sievers E, et al. A recombinant anti-carcinoembryonic antigen immunoreceptor with combined CD3 $\zeta$ -CD28 signalling targets T cells from colorectal cancer patients against their tumour cells [ J ]. *Gut*, 2006, 55( 8 ): 1156-1164.
- [ 57 ] Khong A, Nelson DJ, Nowak AK. The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer [ J ]. *Cytotherapy*, 2012, 14( 7 ): 851-859.
- [ 58 ] 王志华, 吴少雄, 吕玉瑛, 等. 应用 CIK 细胞静脉输注治疗癌症的临床护理 [ J ]. *中国医药科学*, 2012, 2( 17 ): 52-53.
- [ 收稿日期 ] 2013 - 01 - 12      [ 修回日期 ] 2013 - 03 - 04
- [ 本文编辑 ] 王莹, 黄静怡