

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.016

· 短篇论著 ·

## CIK 细胞治疗对肿瘤患者外周血免疫细胞亚型的影响

### Effect of cytokine-induced killer cell therapy on immune cell subsets of peripheral blood in tumor patients

罗光华<sup>1,2</sup>, 马鸣<sup>1</sup>, 郭莉莉<sup>1,2</sup>, 段玉青<sup>1</sup>, 王婷婷<sup>1</sup>, 贾云泷<sup>1</sup>, 韩恒利<sup>2</sup>, 苏镇军<sup>2</sup>, 刘丽华<sup>1</sup>(1. 河北医科大学第四医院生物治疗科, 河北石家庄 050035; 2. 邯钢钢铁集团股份有限责任公司职工医院肿瘤内科, 河北邯郸 056001)

**[摘要]** **目的:**分析接受细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞治疗后肿瘤患者外周血免疫细胞亚型的变化,探讨 CIK 细胞治疗对肿瘤患者免疫功能的影响。**方法:**采集 2012 年 3 月 7 日至 2012 年 8 月 30 日期间河北医科大学第四医院生物治疗科收治的 60 例肿瘤患者(肺癌 25 例、胃癌 8 例、直肠癌 6 例、食管癌 11 例、黑素瘤 7 例和乳腺癌 3 例)外周血及对照组 20 名健康志愿者外周血,分离外周血单个核细胞,常规方法体外扩增 CIK 细胞,分 3 次回输患者体内,流式细胞术检测 CIK 细胞治疗前后肿瘤患者外周血淋巴细胞亚型的变化。**结果:**与治疗前相比,经 1 次 CIK 细胞治疗后,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例升高( $P=0.016$ )、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值升高( $P=0.013$ )且均达到正常水平,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例降低( $P=0.109$ )但仍高于对照组( $P=0.048$ );3 次 CIK 细胞治疗后相比 1 次治疗后无显著变化( $P>0.05$ )。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例经 1 次 CIK 治疗后较治疗前显著下降( $P=0.007$ ),达到正常水平;3 次治疗后持续下降( $P=0.005$ )。CIK 治疗对 CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>B 细胞和 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 自然杀伤(natural killer, NK)细胞水平无显著影响( $P>0.05$ )。**结论:**CIK 细胞治疗能够降低肿瘤患者外周血 Treg 比例,升高 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值,从而减轻或消除肿瘤患者的免疫抑制状态。

**[关键词]** 细胞因子诱导的杀伤细胞;免疫功能;淋巴细胞亚型;调节性 T 细胞;免疫治疗

**[中图分类号]** R730.51; R392.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0475-03

手术、放疗和化疗是肿瘤治疗的三大常规方法,但特异性不足,常对正常组织和器官造成不同程度的损伤。随着生物技术的迅速发展和对肿瘤发生分子机制的深入研究,生物治疗已经成为第四种肿瘤治疗方法。细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是将人体外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子培养后获得的一群异质性细胞<sup>[1-2]</sup>,兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特点<sup>[3]</sup>,是过继性细胞免疫治疗的首选方案<sup>[4]</sup>。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)主要通过抑制 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞活化和增殖、抑制 NK 细胞增殖、产生抑制性细胞因子及清除效应细胞等作用抑制免疫细胞的抗肿瘤作用,使肿瘤细胞发生免疫逃逸,促进肿瘤的进展<sup>[5]</sup>。本研究探讨 CIK 细胞治疗对恶性肿瘤患者免疫功能的影响,为免疫细胞治疗恶性肿瘤提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和仪器

淋巴细胞、DC 细胞培养液 GT-T551、纤维连接蛋白、抗 CD3 单克隆抗体购自宝日医生物技术(北京)有限公司,人淋巴细胞分离液购自天津市川页

生物制品有限公司,IFN- $\gamma$  购自德国美天旎生物技术公司,重组 IL-2(规格:200 万 IU/支)购自山东泉港药业有限公司,20% 人血白蛋白购自瑞士杰特贝林生物制品有限公司,免疫荧光抗体 CD25-PE(REFA07774)、CD3-FITC、CD56-PE、CD4-FITC、CD8-PE 及 CD19-FITC 均购自美国 Beckmen Coulter 公司。

### 1.2 临床资料

选取 2012 年 3 月 7 日至 2012 年 8 月 30 日间河北医科大学第四医院生物治疗科收治的恶性肿瘤患者 60 例,中位年龄 58.6 岁(27~83 岁),其中男性 41 例、女性 19 例。60 例患者包括肺癌 25 例、胃癌 8 例、直肠癌 6 例、食管癌 11 例、黑色素瘤 7 例和乳腺癌 3 例。选择体检门诊健康志愿者 20 人为对照组。免疫细胞治疗方案经过医院伦理委员会批准,患者及对照组(陪同患者就诊的家属)均签署知

**[基金项目]** 教育部博士点新教师基金课题资助(No. 20101323120004)。Project supported by the Doctoral Research Foundation for New Teachers from Ministry of Education(No. 20101323120004)

**[作者简介]** 罗光华(1970-),女,河北省邯郸市人,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤生物治疗研究。E-mail:kuailedeyufei@163.com

**[通信作者]** 刘丽华(Liu Lihua, corresponding author),E-mail:lihua-liu567@hotmail.com

情同意书。

### 1.3 CIK 细胞体外培养

采集肿瘤患者外周血 50 ml, 肝素抗凝, 加等量淋巴细胞分离液, 密度梯度离心法分离淋巴细胞, 将其种植于 CD3-Ab 和纤维连接蛋白包被的培养瓶中, 加入 IL-2 和 IFN- $\gamma$  等细胞因子, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 隔日补充细胞因子及培养基, 体外培养扩增 12 ~ 14 d, 进行细菌、真菌检查。内毒素及革兰阴性菌脂多糖应为阴性。流式细胞术检测培养 CIK 细胞表型后, 将其分 3 次安全回输患者体内 (每次回输细胞数量  $> 1 \times 10^{10}$  个, 活力  $> 95\%$ , 1 次/d, 连输 3 d)。

### 1.4 流式细胞仪检测免疫细胞表达水平

取治疗前后患者血样, 将 100  $\mu$ l 抗凝全血加入管底。同型对照管依次加入 10  $\mu$ l IgG1-ECD、20  $\mu$ l IgG1-FITC 和 IgG1-PE 荧光抗体, T 细胞亚群管依次加入 10  $\mu$ l CD3-ECD、20  $\mu$ l CD4-FITC 和 CD8-PE 荧光抗体, B 细胞管依次加入 20  $\mu$ l CD3-FITC 和 CD19-PE 荧光抗体, NK 细胞管依次加入 20  $\mu$ l CD3-FITC 和 CD56-PE 荧光抗体, Treg 细胞管依次加入

20  $\mu$ l CD4-FITC 和 CD25-PE 荧光抗体。混匀后孵育 30 min。每管内加入 10  $\times$  FACS 溶解液 2 ml, 避光 15 min, 300  $\times g$  离心 5 min, 弃上清液。每管加入 2 ml PBS, 300  $\times g$  离心 5 min, 弃上清, 加 1 ml PBS 重悬细胞。流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Tc、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 和 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞水平在 CIK 细胞治疗前后的变化。

### 1.5 统计学处理

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验及单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤患者与对照组人员外周血免疫细胞水平的差异

与对照组人员相比, 肿瘤患者外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值显著降低, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例显著升高。CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>B 细胞和 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞虽低于对照组但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 CIK 治疗前后肿瘤患者外周血免疫细胞亚型的变化

免疫细胞亚型	对照组	治疗组			<i>P</i>
		治疗前	1 次 CIK 治疗	3 次 CIK 治疗	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T (%)	43.46 $\pm$ 1.73	31.24 $\pm$ 3.58	37.05 $\pm$ 3.16	40.46 $\pm$ 4.48	0.020/0.016/0.349
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T (%)	24.06 $\pm$ 0.56	38.21 $\pm$ 4.59	34.21 $\pm$ 4.49	35.10 $\pm$ 5.12	0.012/0.109/0.515
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1.81 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.21	1.35 $\pm$ 0.23	1.44 $\pm$ 0.32	0.002/0.013/0.831
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg (%)	2.27 $\pm$ 0.47	3.21 $\pm$ 0.46	2.58 $\pm$ 0.55	1.99 $\pm$ 0.50	0.007/0.007/0.005
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> B (%)	9.51 $\pm$ 1.10	8.65 $\pm$ 1.91	7.37 $\pm$ 1.38	6.97 $\pm$ 1.18	0.701/0.289/0.562
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK (%)	13.21 $\pm$ 1.92	9.04 $\pm$ 2.23	9.85 $\pm$ 1.75	8.33 $\pm$ 1.91	0.210/0.729/0.244

*P*: 治疗前 vs 对照组/1 次 CIK 治疗 vs 治疗前/3 次 CIK 治疗 vs 1 次 CIK 治疗

### 2.2 CIK 细胞治疗对肿瘤患者 T 细胞亚型、NK 细胞和 B 细胞的影响

流式细胞术检测结果显示, 与治疗前相比, 肿瘤患者 1 次 CIK 细胞治疗后的 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例显著提高 ( $P = 0.016$ ), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例显著降低 ( $P = 0.109$ ), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例显著降低 ( $P = 0.007$ ), CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>B 淋巴细胞及 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞比例无显著变化 ( $P > 0.05$ )。并且, 治疗 3 次后所有检测的 T 细胞亚型和 Treg 细胞均恢复至正常水平。

### 2.3 CIK 细胞治疗次数对肿瘤患者 T 细胞亚型和 Treg 细胞的影响

与治疗前相比, CIK 细胞治疗 1 次后, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例显著升高 ( $P < 0.05$ )、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例无明显变化 ( $P > 0.05$ )、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值显著升高 ( $P < 0.05$ )、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例显著降低 ( $P < 0.01$ )。与治疗 1 次相比, CIK 细胞治疗 3 次后, 仅 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 比例显著降低 ( $P < 0.01$ ), 其余 T 细胞亚型无显著变化。

### 2.4 CIK 细胞治疗前后肿瘤患者的一般情况变化

CIK 细胞治疗前, 肿瘤患者出现乏力的为 93.3%, 治疗后为 23.3%; 治疗前夜眠差为 80.0%, 治疗后为 43.3%; 治疗前饮食欠佳的为 75.0%, 治疗后为 38.3%; 治疗后患者体力、睡眠和饮食等一

般情况较 CIK 细胞治疗前显著改善。仅有 2 例患者在回输 CIK 细胞时一过性发热,给予患者对症治疗体温恢复正常。说明 CIK 细胞治疗在改善恶性肿瘤患者免疫功能的同时,提高机体的一般情况,且临床治疗安全无明显不良反应。

### 3 讨论

肿瘤患者免疫功能紊乱和低下,其免疫状态在一定程度上可预示着肿瘤的发展和预后,而 T 细胞亚群和 NK 细胞活性变化可反映患者的免疫功能。在消化道癌症、肝癌、乳腺癌等实体瘤患者中都存在 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞明显减少,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞明显增加和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值显著降低,本研究也在肿瘤患者中发现了相同的情况,这与肿瘤患者的细胞免疫功能处于抑制状态、识别和杀伤突变细胞的能力下降有关。

Treg 为 T 细胞独特亚群,直接影响效应细胞的抗肿瘤作用,与肿瘤免疫逃逸关系密切。多项研究<sup>[6-8]</sup>证实,化疗可以通过杀灭免疫抑制细胞(如 Treg)等方式提高机体对肿瘤的免疫应答,增加肿瘤细胞对免疫细胞的敏感性,并能通过抑制肿瘤微环境中的血管生成促进 Treg 凋亡。但化疗有多种不良反应,而 CIK 细胞治疗方法为回输体外培养的自体细胞,因其无不良反应的独特优点而广泛应用于临床上多种恶性肿瘤的治疗,特别是对于手术后清除残留的转移病灶、防止癌细胞扩散和复发以及提高自身免疫力具有显著作用。本研究发现,肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 表达升高,存在免疫逃逸;CIK 细胞治疗 1 次后较 CIK 细胞治疗前 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ );CIK 细胞治疗 3 次后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞进一步降低( $P < 0.01$ ),说明 CIK 细胞治疗能够降低肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的表达以减弱或消除免疫抑制,多次治疗能进一步抑制免疫逃逸,从而增强患者免疫识别和杀伤功能。

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞对普通免疫效应细胞起抑制或杀伤作用,Treg 免疫抑制作用使 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞不能发挥功能<sup>[9-10]</sup>。由此可以推断,CIK 细胞治疗通过降低 Treg 表达、逆转 Treg 对肿瘤患者的免疫抑制作用,使 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞恢复对肿瘤细胞的杀伤功能;升高 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值,增强患者免疫杀伤能力。

总之,CIK 细胞为主的过继性细胞免疫治疗可逆转 Treg 对肿瘤患者的免疫抑制作用并提高免疫细胞杀伤活性,恢复患者的免疫功能,同时能够减轻肿瘤患者的不良作用,提高患者生活质量。

### [参考文献]

- [1] Schmidt-wolf IG, Lefterova P, Johnston V, et al. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers [J]. Br J Haematol, 1994, 87(3): 453-458.
- [2] Finke S, Trojaneck B, Lefierova 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] Wan FS, LiuMX, Zhang B, et al. Antitumor activities of human autologous cytoine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 464-468.
- [4] 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.
- [5] Andersen MH, Sorensen RB, Brimnes MK, et al. Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8<sup>+</sup>T cells in cancer patients [J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2245-2256.
- [6] Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice [J]. Clin Invest, 2010, 120(4): 1111-1124.
- [7] Ramakrishnan R, Gabrilovich DI. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(3): 419-423.
- [8] Richards L. Chemotherapy: Conventional chemotherapy boosts the effect of cancer vaccines [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(6): 297.
- [9] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2): 606-612.
- [10] Read S, Malmstrm V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation [J]. Exp Med, 2000, 192(2): 295-302.

[收稿日期] 2013-02-27

[修回日期] 2013-05-10

[本文编辑] 黄静怡