

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.010

· 临床研究 ·

自然杀伤细胞治疗晚期肝癌的近期临床疗效

荆娜^{1,2}, 张金超², 杨岩丽², 吴琼², 孙雪冬², 张晓燕², 赵来伟², 潘欣², 蒋昊², 丁国梁², 王丹红², 陈虎² (1. 国防大学医院 内科, 北京 100091; 2. 军事医学科学院附属 307 医院 造血干细胞移植研究所, 北京 100071)

[摘要] **目的:** 评价自然杀伤(natural killer, NK)细胞治疗晚期肝癌的近期临床疗效、安全性以及其对肝癌患者外周血淋巴细胞亚群和NK细胞活性的影响。**方法:** 采集解放军307医院2013年9月至2015年9月所收治的30例晚期肝癌患者的外周血,经体外培养诱导产生NK细胞,于第14、15天进行细胞回输,连续2次回输为1疗程,共进行2个疗程治疗,分别于每疗程细胞治疗前及治疗完成2周后取患者外周血检测淋巴细胞亚群及NK细胞活性,比较治疗前、后各淋巴细胞亚群与NK细胞比例的变化,观察与临床疗效的关系。**结果:** 30例晚期肝癌患者经NK细胞治疗后PR 4例,SD 19例,PD 7例;客观缓解率为13.3%,疾病控制率为76.7%;细胞免疫治疗前后淋巴细胞亚群无明显变化,NK细胞活性较治疗前明显提高[(6.68±3.83)% vs (5.06±4.46)%, $P<0.05$]。治疗过程中30例患者均未出现不良反应。**结论:** NK细胞免疫治疗可提高机体抗肝癌免疫效应,可减缓病情进展,安全性高,为晚期肝癌患者开辟一条新的治疗途径。

[关键词] 自然杀伤细胞;肝癌;临床疗效

[中图分类号] R735.7; R730.51

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0515-04

Natural killer cell treatment for advanced hepatocellular carcinoma patients: an observation of recent clinical curative effect

JING Na^{1,2}, ZHANG Jinchao², YANG Yanli², WU Qiong², SUN Xuedong², ZHANG Xiaoyan², ZHAO Laiwei², PAN Xin², JIANG Hao², DING Guoliang², WANG Danhong², CHEN Hu² (1. Department of Internal Medicine, Hospital of National Defense University of PLA, Beijing 100071, China; 2. Institution of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, No. 307 Hospital of PLA Affiliated to Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To observe and evaluate the clinical efficacy and safety of natural killer cells (NK) on advanced hepatocellular carcinoma (HCC), as well as its influence on the activities of lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells in peripheral blood of HCC patients. **Methods:** We collected peripheral blood (PB) from 30 patients with advanced hepatocellular carcinoma from September 2013 to September 2015 at No. 307 Hospital of PLA. The NK cells were generated through cultivation and induction *in vitro*, and were re-transfused into patients at the 14th and the 15th day. Two consecutive transfusions were regarded as one cycle, and there were totally two cycles. We detected the activities of lymphocyte subsets and NK cells in peripheral blood at pre-treatment and 2 weeks post-treatment for each cycle, respectively, and observed the activity changes of the lymphocyte subsets and NK cells before and after the treatment as well as its relationship to clinical efficacy. **Results:** Among the 30 HCC patients, there were 4 cases of PR, 19 cases of SD and 7 cases of PD after NK treatment; the objective response rate and disease control rate were 13.3% and 76.7% respectively. The lymphocyte subsets didn't show obvious change, but the NK cell activity increased significantly after the treatment ([5.06±4.46]% vs [6.68±3.83]%, $P<0.05$). None of the 30 patients had adverse effects. **Conclusion:** The NK cell immunotherapy can improve the anti-tumor and immunity effect of body and slow-down the disease progression; it is a new and safe treatment approach for HCC patients.

[基金项目] 国家科技重大专项“十二五”计划基金资助项目(No. 2009zx09503)。Project supported by the Key Science and Technology Foundation of “12th Five-Year Plan” of China (No. 2009zx09503)

[作者简介] 荆娜(1982-),女,山东省淄博人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的临床研究, E-mail: jingnade@sina.com

[通信作者] 陈虎(CHEN Hu, corresponding author), E-mail: chenhu217@yahoo.com.cn; 王丹红(WANG Danhong, co-corresponding author), E-mail: wangdh307@sina.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160711.1041.016.html>

[**Key words**] natural killer (NK) cell; hepatocellular carcinoma; clinical curative efficacy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 515-518. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.010]

原发性肝癌是世界范围内五大常见恶性肿瘤之一,据国际癌症研究中心^[1]统计数据显示,肝癌在全球发病率逐年增长,已超过 62.6 万/年,病死率近 60 万/年。由于其病程发展快、恶性程度高、早期诊断率低、预后较差,严重危害人类生命健康^[2]。目前早期手术切除仍是肝癌的主要治疗手段,但大多数患者确诊时已属中晚期或合并严重肝硬化而失去手术切除的机会,部分患者可通过放射治疗和介入治疗^[3]。但由于晚期肝癌患者免疫功能低下,采取单一的治疗手段可能会对患者产生难以预测的不良后果^[4-6]。近年来,肿瘤免疫治疗已广泛应用,逐渐成为实体肿瘤治疗的全新模式,被认定为肿瘤治疗的第四大手段^[7]。NK 细胞无需抗原预先致敏即可对肿瘤进行杀伤,随着肿瘤免疫学的快速发展及临床免疫治疗研究的深入,NK 细胞的疗效逐渐被临床实践所证实。本研究采用 NK 细胞治疗晚期肝癌患者 30 例,回顾性评价 NK 细胞免疫治疗对晚期肝癌患者治疗的有效性及其安全性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2013 年 9 月至 2015 年 9 月在解放军 307 医院造血干细胞移植科采用 NK 细胞免疫治疗的晚期可评估的肝癌患者 30 例,其中男性 25 例、女性 5 例;年龄 34 ~ 88 岁,中位年龄 51 岁;随访时间 3 ~ 24 个月,中位随访时间 12 个月。入选标准:组织学或细胞学明确诊断为肝癌;接受过肝癌的规范化治疗(包括手术、介入等);末次治疗结束至开始接受 NK 细胞免疫治疗的间隔时间 ≥ 8 周;患者预期生存 > 3 个月;KPS 评分 > 60 分;无严重病毒细菌感染。排除标准:正在接受放疗、化疗或其他全身抗肿瘤治疗者;同时存在其他恶性肿瘤及传染性疾病者;大手术伤口未完全愈合者;怀孕或哺乳期妇女;存在本治疗不允许的体检或实验指标异常者;对生物制品过敏者。本临床试验经解放军 307 医院伦理委员会审查批准,全部受试患者均签署知情同意书。患者一般资料见表 1。

1.2 NK 细胞培养

采集肿瘤患者抗凝全血 35 ml,用 10 ml NKGM 培养基重悬细胞沉淀、计数;用 NKGM-bottle 培养基将细胞密度调整至 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^6/\text{ml}$,其中含有 10% 自体血浆、500 U/ml 的 rhIL-2,然后用 50 ml 注

表 1 30 例肝癌患者的一般资料

Tab. 1 Demographic and clinical features of 30 patients with hepatocellular carcinoma

Category	n	Percentage (%)
Gender		
Male	25	83
Female	5	17
Age (median, t/a)		
<60 (49, 34-59)	23	77
≥60 (62, 60-88)	7	23
Pathologic type		
Hepatocellular carcinoma	30	100
Treatment before cellular therapy		
Surgery	13	43
Intervention	11	37
Radiotherapy/Targeted therapy	6	20
Sites of metastatic		
Extrahepatic	12	40
Intra-hepatic	18	60
Clinical efficacy		
PR	3	10
SD	20	66
PD	7	24

射器将上述约 45 ml 细胞悬液注入初始培养袋中,将培养袋放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,培养 3 d,取出培养袋,加入含 500 U/ml IL-2 的(约 25 ml 新鲜培养基;第 4 天,将刺激活化的 PBMC 进行 NK 细胞扩增培养。将初始培养袋的细胞平均分入两个 NKGM 大培养袋中,培养 4 d;第 8 天,根据培养情况每个袋中加入约 100 ~ 200 ml 新鲜培养基(含 IL-2 150 000 U);第 11 天,进行细菌、真菌检测,再次加入约 100 ~ 200 ml 新鲜培养基(含 IL-2 100 000 U);LPS 检测,流式分析细胞数计算,继续培养 3 d,培养后 NK 细胞占比为 40% ~ 60%,于第 14 天即收获 NK 细胞。

1.3 NK 细胞治疗方案

所有患者接受专科治疗后,进行 NK 细胞免疫治疗,具体方案:采集细胞当日为第 0 天,分别于第 14、15 天静脉回输细胞,回输总数为 $(5 \sim 10) \times 10^9$ 个。连续 2 次为一疗程,共 2 个疗程。

1.4 疗效评价

1.4.1 评价方法 患者接受治疗 1 个月后进行原病灶及转移灶的 CT 扫描, 评估疾病状态; 治疗 3 个月后再次评估疾病状态; 之后 3~6 个月复查一次, 若患者出现异常症状和体征, 随时进行随访复查。临床疗效按实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST), 分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、病情稳定(stable disease, SD)和疾病进展(progression disease, PD), 以 CR + PR 计算客观缓解率(objective response rate, ORR), CR + PR + SD 计算疾病控制率(disease control rate, DCR)。不良反应按 WHO(1998) 统一标准进行评价, 分为 0~IV 度。

1.4.2 流式细胞术检测 NK 治疗对患者淋巴细胞亚群及 NK 细胞活性的影响 分别在每疗程 NK 细胞治疗前及最后一次回输细胞 2 周后抽取患者外周血 2 ml, 流式细胞术检测患者外周血淋巴细胞亚群指标 CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ (辅助性/诱导性 T 细胞)、CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ (细胞毒/抑制性 T 细胞)、CD3⁺ CD19⁻ (总 T 淋巴细胞) 以及 CD3⁻ CD56⁺ (NK 细胞) 活性的动态变化。

1.5 安全性评价

观察患者治疗前后血常规、肝肾功的变化, 以及

治疗过程中所出现的不良反应, 如有无发热、皮疹、呕吐、腹泻等不良反应。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对数据进行正态性检验, 符合正态分布, 采用配对 *t* 检验; 不符合正态分布, 采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

30 例晚期肝癌患者经 NK 细胞免疫治疗后, 随访 3~24 个月。临床疗效显示: PR 4 例, SD 19 例, PD 7 例; ORR 为 13.3%, DCR 为 76.7%, 见表 1。近期评价有效患者一般情况改善, 生活质量提高。

2.2 治疗后外周血淋巴细胞亚群及 NK 细胞活性变化

动态观察患者接受 NK 细胞免疫治疗前后淋巴细胞亚群及 NK 细胞活性的变化情况(表 2), 与治疗前比较, 30 例肝癌患者的淋巴细胞亚群中, CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺、CD3⁺ CD19⁻ 细胞比例治疗前后无明显变化。CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞比例在治疗后明显增加 ($P < 0.05$)。

表 2 30 例肝癌患者接受 NK 治疗前、后淋巴细胞亚群比例的变化($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Proportional changes of of T-lymphocyte subsets and NK cells before and after the NK treatment in 30 HCC patients($\bar{x} \pm s, \%$)

Lymphocyte subset	Pre-treatment	Post-treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	33.24 ± 10.49	32.70 ± 10.34	-0.106	0.915
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	31.60 ± 12.03	32.12 ± 12.41	-0.238	0.812
CD3 ⁺ CD19 ⁻	66.44 ± 15.01	69.50 ± 10.06	-0.929	0.353
CD3 ⁻ CD56 ⁺ (NK)	5.06 ± 4.46	6.68 ± 3.83*	-2.053	0.040

* $P < 0.05$ pre-treatment

2.3 安全性

在接受 NK 细胞免疫治疗的 30 例晚期肝癌患者中, 治疗前后血常规、肝肾功能无明显变化, 30 例患者均未出现明显不良反应。

3 讨论

Wada 等^[8]通过肝癌术后病理切片检验发现淋巴细胞浸润是预后较好的标志, 这表明肝癌组织中的免疫细胞具有抗肿瘤作用。活化的 NK 细胞能扩散、浸润至感染源或肿瘤组织中发挥抗肿瘤作用, 是一类杀瘤活性强和杀瘤谱广的抗肿瘤效应细胞^[9]。

肝癌患者体内回输 NK 细胞, 不损伤机体免疫系统功能, 还可直接杀伤肿瘤细胞并调节和提高机体的免疫功能, 在很大程度上提高患者放、化疗的疗效, 减轻放、化疗所带来的不良反应, 特别是对某些不适合手术、又不能耐受放疗和化疗的中晚期肿瘤患者或年老体弱肿瘤患者也可以起到提高生活品质、延长生存时间的重要作用^[10-11]。肝 NK 细胞和肝癌等的发生、发展有明确的关系^[12]。Taketomi 等^[14]研究发现, 肝癌患者的 NK 细胞活性明显下降, 而且通过随访, 认为术前检测 NK 细胞活性的高低有助于预测肝癌术后是否复发及判断其预后。还有研

究^[13]表明,体外激活培养的NK细胞对肝癌细胞有明显的杀伤作用。

本研究以ORR和DCR为研究终点,30例晚期肝癌患者接受NK细胞免疫治疗后PR 4例、SD 19例、PD 7例;ORR为13.3%、DCR为76.7%,患者未出现明显不良反应。接受NK细胞免疫治疗后部分患者生活质量提高。目前NK细胞对肿瘤的免疫监视已得到多方面研究的支持^[14],体外研究显示NK细胞可以杀灭多种肿瘤的细胞株;NK细胞免疫治疗应用于多个动物模型试验,发现其能有效抑制肿瘤生长;一些临床研究也表明NK细胞可以靶向杀伤肿瘤。一项分析我国NK细胞治疗恶性肿瘤的研究^[15]结果显示,传统治疗方案与NK细胞治疗联合可显著改善患者生存、缓解因肿瘤引起的疼痛和疲劳、提高免疫功能,治疗后CD4⁺/CD8⁺比值及CD56⁺比例显著上升,且整体安全性好。另一项NK细胞治疗晚期恶性肿瘤转移灶的临床研究^[16]结果提示,经NK细胞治疗后,近期临床效果较为显著。本研究结果显示部分肝癌患者的NK细胞活性有不同程度提高($P < 0.05$),有效促进了患者免疫功能。NK细胞在抗肿瘤及免疫调节方面起重要作用,对免疫调节、抗肿瘤方面意义重大。

综上所述,本研究30例晚期肝癌患者接受了NK细胞免疫治疗后临床症状得到改善,提高了患者免疫功能和生活质量,不仅在一定程度上提高临床疗效,更重要的是减缓了晚期肝癌的疾病进展。但在以NK细胞治疗肝癌的临床治疗中也带来了一定的思考,如何能够从NK细胞的培养本身以及回输层面上保证NK细胞的质量及杀伤功能?而且亟需建立效果评估标准(免疫学评估和临床评估),以更加科学有效地反映NK细胞治疗肝癌的临床疗效;另外,本研究为回顾性的病例分析,病例较少,随访时间不长,对NK细胞治疗晚期肝癌的疗效特别是远期疗效及对肿瘤患者生存期的影响,仍需进一步通过随机对照的临床试验加以验证。

[参考文献]

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-70. DOI: 10.3322/caac.20107.
- [2] CARTIER V, AUBÉ C. Diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Diagn Interv Imaging*, 2014, 95(8):709-719. DOI: 10.1016/j.diii.2014.06.004.
- [3] SCHÜTTE K, SCHULZ C, PORANZKE J, et al. Characterization and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) in the non-cirrhotic liver [J/OL]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:

117 [2015-12-20]. <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-14-117>. DOI: 10.1186/1471-230X-14-117.

- [4] BARMAN P M, SHARMA P, KRISHNAMURTHY V, et al. Predictors of mortality in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(11):2821-2825. DOI: 10.1007/s10620-014-3247-7.
- [5] HONDA Y, KIMURA T, AIKATA H, et al. Pilot study of stereotactic body radiation therapy combined with transcatheter arterial chemoembolization for small hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2014, 61(129):31-36.
- [6] FLORES A, MARRERO J A. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics [J/OL]. *Clin Med Insights Oncol*, 2014, 8: 71-76 [2015-12-20]. <http://www.la-press.com/emerging-trends-in-hepatocellular-carcinoma-focus-on-diagnosis-and-the-article-a4210>. DOI: 10.4137/CMO.S9926.
- [7] HONTSCHA C, BORCK Y, ZHOU H, et al. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2):305-310. DOI: 10.1007/s00432-010-0887-7.
- [8] WADA Y, NAKASHIMA O, KUTAMI R, et al. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration [J]. *Hepatology*, 1998, 27(2):407-414.
- [9] LUNEMANN S, SCHLAPHOFF V, CORNBERG M, et al. NK cells in hepatitis C: role in disease susceptibility and therapy [J]. *Dig Dis*, 2012, 30 (Suppl 1): 48-54. DOI: 10.1159/000341680.
- [10] YANG H, LAN P, HOU Z, et al. Histone deacetylase inhibitor SAHA epigenetically regulates miR-17-92 cluster and MCM7 to up-regulate MICA expression in hepatoma [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(1):112-121. DOI: 10.1038/bjc.2014.547.
- [11] BI J, ZHENG X, CHEN Y, et al. TIGIT safeguards liver regeneration through regulating natural killer cell-hepatocyte crosstalk [J]. *Hepatology*, 2014, 60(4):1389-1398. DOI: 10.1002/hep.27245.
- [12] TAKEYOMI A, SHIMADA M, SHIRABE K, et al. Natural killer cell activity in patient with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy [J]. *Cancer*, 1998, 83(1):58-63.
- [13] DU X, BAI Z, ZHANG J, et al. Prolonged survival of human hepatocarcinoma cells in the liver of newborn C57BL/6 mice and resulting cellular xenorejection, especially the activation of hepatic natural killer T cells [J]. *Pathobiology*, 2010, 77(3):115-128. DOI: 10.1159/000292645.
- [14] CALDWELL S, PARK S H. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44 (Suppl 19): 96-101. DOI: 10.1007/s00535-008-2258-6.
- [15] 杨波, 李婷婷, 向永胜, 等. 60例自然杀伤细胞治疗恶性肿瘤的临床疗效评价 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(14):107-109.
- [16] 黎建军, 何诗萍, 古模发, 等. NK细胞对不同的人肝癌株的杀伤作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(4):663-677.

[收稿日期] 2016-02-03

[修回日期] 2016-05-24

[本文编辑] 黄静怡