

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.10.013

NK细胞治疗卵巢癌腹腔积液的近期疗效

胡建华, 张燕[△], 江龙委, 高艳荣, 史瑞芳, 赵华, 姚露, 贾绍昌(东部战区总医院秦淮医疗区 生物治疗科, 江苏南京 210002)

[摘要] **目的:** 探讨自然杀伤细胞(natural killer, NK细胞)腹腔灌注治疗卵巢癌腹腔积液的近期临床效果和安全性。**方法:** 分析2016年11月至2019年1月在东部战区总医院秦淮医疗区15例接受NK细胞腹腔灌注治疗的卵巢癌腹腔积液患者的临床资料,采集患者外周血、分离外周血单个核细胞,经培养后收获NK细胞、腹腔内灌注NK细胞悬液(不低于 2×10^9 个细胞/次)。检测治疗前后患者腹腔积液量、血清肿瘤标志物CA-125水平、血清细胞因子IL-2、INF- γ 和TNF- α 水平,以及外周血淋巴细胞亚群的变化,观察其临床疗效和不良反应。**结果:** NK细胞腹腔灌注治疗后,有效率为66.7%,未出现明显的治疗相关不良反应。与治疗前比较,治疗2周后患者血清肿瘤标志物CA-125水平显著下降($P < 0.05$),IL-15、INF- γ 和TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而外周血淋巴细胞亚群无明显变化(均 $P > 0.05$)。**结论:** NK细胞腹腔灌注治疗卵巢癌腹腔积液近期临床效果较好,不良反应小,是一种有前景的治疗癌性腹腔积液的方法。

[关键词] 卵巢癌;腹腔积液;自然杀伤细胞;CA-125;IL-2;INF- γ ;TNF- α

[中图分类号] R737.31; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)10-1152-04

Short-term treatment efficacy of NK cells for ovarian cancer ascites

HU Jianhua, ZHANG Yan[△], JIANG Longwei, GAO Yanrong, SHI Ruifang, ZHAO Hua, YAO Lu, JIA Shaochang (Department of Tumor Biotherapy, Qinhuai Medical District of the General Hospital of Eastern Theater Command of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the short-term clinical efficacy and safety of intraperitoneal perfusion of natural killer (NK) cells in the treatment of ovarian cancer with ascites. **Methods:** The clinical data of 15 ovarian cancer patients with ascites effusion, who received NK cell perfusion in the Qinhuai Medical District of the General Hospital of Eastern Theater Command from November 2016 to January 2019, were analyzed. The peripheral blood was collected to isolate the peripheral blood mononuclear cells, and to further obtain the NK cells after culture. NK cell suspension was intraperitoneally perfused into the abdominal cavity (no less than 2×10^9 cells/time). The volume of peritoneal effusion, the level of serum tumor marker CA-125, the level of serum cytokines IL-2, INF- γ and TNF- α as well as the changes in peripheral blood lymphocyte subsets were detected before and after the treatment; Moreover, the clinical efficacy and adverse reactions were observed. **Results:** The effective rate of intraperitoneal perfusion of NK cells was 66.7%, and there were no obvious treatment-related adverse reactions. Compared with before treatment, the serum tumor marker CA-125 level significantly decreased after treatment ($P < 0.05$), and the levels of IL-15, INF- γ and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while there was no significant changes in peripheral blood lymphocyte subsets (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Intraperitoneal infusion of NK cells in the treatment of ovarian cancer associated peritoneal effusion has a good short-term clinical efficacy with little adverse reactions, which is a promising method for the treatment of cancerous peritoneal effusion.

[Key words] ovarian cancer; ascites; natural killer cell; CA-125; IL-2; INF- γ ; TNF- α

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(10): 1152-1155. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.10.013]

卵巢癌由于目前缺少有效的诊断方法,首发初诊时70%~80%患者已经是中晚期,患者5年生存率仍然低于50%,其病死率居于女性生殖系统肿瘤的前列^[1-2]。癌性腹腔积液是与恶性肿瘤相关的腹腔内液体积聚,是肿瘤细胞、免疫细胞和免疫调节因子的储存库,可以促进肿瘤的生长并抑制宿主免疫系统,是晚期卵巢癌常见并发症之一,超过1/3的晚期卵巢癌患者诊断时伴癌性腹腔积液,腹腔积液是晚期卵巢癌的不良预后因子^[3-5]。自然杀伤细胞(natural killer

[基金项目] 南京军区医学科技创新课题重点项目(No. 15ZD018)。Project supported by the Key Program of Medical Science and Technology Innovation of Nanjing Military Area Command (No. 15ZD018)

[作者简介] 胡建华(1964-),男,硕士,主任医师,主要从事肿瘤的生物及外科治疗,E-mail: jianglw2005@163.com;张燕(1978-),女,硕士,主治医师,主要从事肿瘤的生物治疗,E-mail: 3405240435@qq.com。[△]为并列第一作者

[通信作者] 贾绍昌(JIA Shaochang, corresponding author),博士,主任医师、教授,博士生导师,主要从事肿瘤的生物治疗,E-mail: jiashaochang@sina.com

cell, NK细胞)是先天性免疫系统的重要组成部分,是一种表达CD56或CD16的淋巴细胞(CD2⁺CD3⁻),NK细胞机体抗御感染和防止细胞癌性转化的重要免疫调节细胞,NK细胞无需肿瘤特异性抗原识别、非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性的直接杀伤肿瘤细胞,是肿瘤免疫的重要效应细胞^[6-10]。腹腔积液中的NK细胞,其细胞表型会发生改变,同时细胞毒性功能受损^[11]。NK细胞治疗是实体肿瘤及血液系统肿瘤治疗的一个重要方向,已有许多研究^[12-17]证实NK细胞治疗是安全有效的。本研究通过NK细胞腹腔灌注治疗15例卵巢癌癌性腹腔积液患者,旨在评价NK细胞腹腔灌注治疗卵巢癌腹腔积液的有效性及其安全性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2016年11月至2019年1月东部战区总医院秦淮医疗区生物治疗科收治的15例卵巢癌患者,其中7例为肿瘤细胞减免术后复发,8例诊断时为晚期卵巢癌,均经B超证实为中大量(>1 000 ml)腹腔积液,且对铂类药物不耐受,所有患者血清CA-125检测在350 U/ml以上。15例患者平均年龄54岁,KPS评分平均为62分;病理类型:9例浆液性腺癌,2例透明细胞,3例乳头状癌,1例子宫内膜样癌;肿瘤侧别:左侧、右侧及双侧的各为5例;分化程度:中分化8例,低分化7例;15例患者均有远处转移,其中多发转移的为7例,大网膜转移的为3例,骨盆转移的为1例,肺转移的为2例,胸膜转移的为2例。

病例纳入标准:年龄大于18岁的卵巢癌患者;重要脏器功能正常;无自身免疫性疾病;卡氏评分在60分以上。病例排除标准:怀孕或哺乳期妇女;脏器(肝、心和肾等)移植者;严重的不可控制的感染;未签署知情同意书者。治疗前腹腔积液量的判定标准:根据腹腔积液超声报告腹水分布及深度径线值综合评估。重度腹腔积液:腹腔积液分布弥漫于肝前及腹腔,腹腔积液深度径线值 ≥ 10 cm;中度腹腔积液:腹腔积液介于轻重度之间,腹腔积液深度径线值5~9 cm;轻度腹腔积液:腹腔积液局限于肝肾隐窝或盆腔,腹腔积液深度径线值 ≤ 4 cm。所有患者均签署知情同意书,研究方案征得医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

人白细胞介素-2(rhIL-2)购自北京双鹭药业,Ficoll分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,NK细胞培养基购自珠海贝索公司,内毒素检测试剂盒购自湛江博康公司,流式抗体试剂为BD公司产品,细胞因子ELISA试剂盒为R&D Systems公

司产品,肿瘤相关抗原CA-125定量测定试剂盒(化学发光法)为北京大成生物工程有限公司产品。

1.3 NK细胞体外扩增

使用肝素抗凝采集患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)约60 ml,常规密度梯度法分离PBMC,重悬细胞后铺于预包被的细胞培养瓶中,于培养瓶内加入含18 ml活化培养基及2 ml血浆,置于37℃、5%CO₂培养箱中。按说明书步骤进行后续培养,根据细胞生长情况添加新鲜培养基。培养第14 d时收获NK细胞,通过形态学、特异性表面标志物等进行鉴定,真菌、细菌、内毒素检测合格后方可进行NK细胞回输,同时终产品留样备查。按《中华人民共和国药典》2015版第三部规定的方法进行内毒素和无菌的检测。以上操作均在符合GMP条件的实验室进行。经流式细胞术检测,证明所有患者的NK细胞均合格,平均CD56阳性率为95.2%。

1.4 治疗方法

患者取仰卧位,B超定位穿刺点,放置腹腔引流管持续引流积液,于4~5 d内引流干净。腹腔内灌注NK细胞悬液,每位患者输注1次,注入细胞数不低于 2×10^9 个,15例患者输注的平均NK细胞的数量为 3.43×10^9 个。合并治疗包括补充蛋白、利尿、静脉营养支持治疗、维持水电解质平衡等。

1.5 临床观察

(1)疗效评定:治疗2个疗程后,按照世界卫生组织(WHO)癌性腹腔积液疗效评定标准:完全缓解(CR):腹腔积液消失,症状完全缓解维持4周以上;部分缓解(PR):腹腔积液减少>50%,症状改善维持4周以上;无效(NC):腹腔积液未减少或增加,4周内需要反复抽液者;稳定(SD):腹腔积液减少不足50%,并持续4周以上;有效率:CR+PR。

(2)毒副作用:在每次细胞输注后30 min及24 h,依据美国通用药物毒性反应标准(NCI-CTC 4.0)记录和评价不良反应,患者每周查血常规1~2次,每周治疗前查肝、肾功能、心电图,疗程结束后全面检查。

(3)肿瘤标志物:NK细胞腹腔灌注前2 d以及每疗程结束后2周检测肿瘤标志物CA-125。

(4)细胞因子:NK细胞腹腔灌注前2 d和治疗后第3天,检测血清Th1型细胞因子IL-2、INF- γ 和TNF- α 的水平。

1.6 统计学处理

应用SPSS 17.0软件进行统计分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后数据比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK 细胞治疗卵巢癌腹腔积液的近期疗效

NK 细胞腹腔灌注治疗 2 个疗程后随访 1 个月, CR 2 例、PR 8 例、SD 2 例、NC 3 例, 有效率为 66.7%。

2.2 NK 细胞治疗未出现 3 级及以上不良反应

治疗期间 3 例出现发热, 体温 37.5 °C~39 °C, 均 6~24 h 后自行缓解。无一例发生腹腔内感染及肠粘连、肠梗阻等后遗症。未出现恶心、呕吐、头痛等症状, 未发现 3 级及以上不良反应。

2.3 NK 细胞治疗后 CA-125 水平显著下降

15 例患者于治疗前、治疗 2 周后分别检测血清肿瘤标志物 CA-125 水平, 结果发现, 与治疗前比较, 治疗后 2 周 CA-125 水平显著下降 [(253.25±84.17) vs (465.59±59.61) U/ml, $t=2.53, P<0.05$]。

2.4 NK 细胞治疗外周血淋巴细胞亚群无显著变化

与治疗前比较, NK 细胞治疗后卵巢癌患者外周血中淋巴细胞亚群的百分率差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$, 表 1)。

表 1 患者治疗前后外周血淋巴细胞亚群的变化

Tab.1 Changes in peripheral blood lymphocyte subsets of patients before and after treatment

Lymphocyte subset	Pre-treatment (%)	Post-treatment (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
CD3 ⁺	75.30±11.82	77.27±13.64	1.198	0.436
CD4 ⁺	26.38±10.33	25.37±9.02	1.075	0.471
CD8 ⁺	24.23±12.45	26.43±10.38	1.335	0.283
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.15±0.71	1.20±0.72	-1.504	0.170
CD3 ⁺ CD56 ⁺	21.25±25.02	23.70±8.38	0.998	0.326
CD4 ⁺ CD25 ⁺	2.26±1.10	2.13±0.90	0.418	0.673

2.5 NK 细胞治疗后 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 水平显著升高

患者治疗前后 Th1 型细胞因子 IL-2、INF- γ 、TNF- α 水平检测结果见表 2。与治疗前比较, NK 细胞治疗后患者血清 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 治疗前后细胞因子变化 [ρ_B /(pg·ml)]

Tab.2 Changes in peripheral blood cytokines before and after treatment [ρ_B /(pg·ml)]

Group	IL-15	IFN- γ	TNF- α
Pre-treatment	25.4±6.9	12.8±6.1	21.4±14.1
Post-treatment	52.4±16.1	47.6±17.5	40.2±13.7
<i>t</i>	3.875	3.152	2.741
<i>P</i>	0.002	0.015	0.033

3 讨论

癌性腹腔积液是晚期卵巢癌患者的常见表现, 此类患者往往生活质量极差, 生存期短, 治疗上以改善症状为主。目前, 治疗癌性腹腔积液的方法主要有化疗药物灌注、抗血管生成药物灌注等, 其疗效有限且不持久^[4-5, 18-20], 癌性腹腔积液的发病机制目前尚未完全清楚。NK 细胞可分为两个主要的亚组: CD56^{bright}CD16⁻或 CD56^{dim}CD16⁺。约 40% 的卵巢癌腹腔积液中 NK 细胞属于弱细胞毒性 CD56^{bright}CD16⁻亚

群, 而超过 90% 的外周血中 NK 细胞携带细胞毒杀伤的 CD56^{dim}CD16⁺ 表型^[11]。腹腔积液中 CD56^{bright}CD16⁻ 表型的 NK 细胞推测可能发挥促血管生成和促癌作用^[14]。考虑到细胞毒性 NK 细胞 (CD56^{dim}CD16⁺) 的治疗潜力^[13-17], 细胞毒性 NK 细胞是治疗癌性腹腔积液的一个潜在方法。

IL-15、IFN- γ 和 TNF- α 在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用, 如 IL-15 刺激 NK 细胞的杀瘤活性^[21], IFN- γ 具有较强的抗肿瘤和免疫调节作用, TNF- α 可直接造成肿瘤细胞的凋亡。本研究中 NK 细胞灌注后, 卵巢癌患者血清细胞因子检测结果显示, IL-15、IFN- γ 和 TNF- α 水平明显升高, 提示 NK 细胞灌注能诱导增强的体内抗肿瘤细胞免疫。

本研究观察 NK 细胞腹腔灌注治疗癌性腹腔积液的疗效, 15 例卵巢癌患者均完成 2 个疗程的治疗, 结果显示 NK 细胞腹腔灌注治疗可明显减轻腹腔积液量, 其有效率为 66.7%, 治疗 2 周后患者血清肿瘤标志物 CA-125 水平显著下降: 整个治疗过程均未发生 3 级及以上严重不良反应, 未出现腹腔内感染及肠粘连、肠梗阻等后遗症。结果提示, NK 细胞腹腔灌注治疗卵巢癌腹腔积液不良反应小, 患者耐受性好, 尤其对于肝肾功能障碍、一般情况较差无法耐受化疗的腹腔积液患者, NK 细胞腹腔灌注是一种有前景的治疗方法, 其远期疗效有待在后续临床研究中进一步探索。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] AHMED N, STENVERS K L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research [J/OL]. *Front Oncol*, 2013, 3: 256[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3782691/>. DOI: 10.3389/fonc.2013.00256.
- [4] KIPPS E, TAN D S, KAYE S B. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research[J/OL]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 273-282[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4673904/>. DOI: 10.1038/nrc3432.
- [5] HODGE C, BADGWELL B D. Palliation of malignant ascites[J]. *J Surg Oncol*, 2019, 120(1): 67-73. DOI: 10.1002/jso.25453.
- [6] KOBAYASHI T, MATTAROLLO S R. Natural killer cell metabolism [J]. *Mol Immunol*, 2019, 115: 3-11. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.11.021.
- [7] DYCK L, LYNCH L. New job for NK cells: architects of the tumor microenvironment[J]. *Immunity*, 2018, 48(1): 9-11. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.01.001.
- [8] BARROW A D, COLONNA M. Tailoring natural killer cell immunotherapy to the tumour microenvironment[J/OL]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 30-36[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5659759/>. DOI: 10.1016/j.smim.2017.09.001.
- [9] DEL ZOTTO G, MARCENARO E, VACCA P, et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017, 92(2): 100-114. DOI: 10.1002/cyto.b.21508.
- [10] MINETTO P, GUOLO F, PESCE S, et al. Harnessing NK cells for cancer treatment[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2836[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6908847/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02836.
- [11] FANG F, XIAO W H, TIAN Z G. NK cell-based immunotherapy for cancer[J]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 37-54. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.009.
- [12] SOUZA-FONSECA-GUIMARAES F, CURSONS J, HUNTINGTON N D. The emergence of natural killer cells as a major target in cancer immunotherapy[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(2): 142-158. DOI: 10.1016/j.it.2018.12.003.
- [13] WU J J, WAXMAN D J. Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy[J/OL]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 210-221[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818299/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.050.
- [14] HANNANI D, SISTIGU A, KEPP O, et al. Prerequisites for the anti-tumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy[J]. *Cancer J*, 2011, 17(5): 351-358. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3182325d4d.
- [15] SUN H Y, SUN C. The rise of NK cell checkpoints as promising therapeutic targets in cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2354[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6812684/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02354.
- [16] KIM N, KIM H S. Targeting checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of natural killer cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2041[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6139314/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02041.
- [17] GUILLEREY C, HUNTINGTON N D, SMYTH M J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(9): 1025-1036. DOI: 10.1038/ni.3518.
- [18] 王志华. NK 细胞抗肿瘤临床转化研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(3): 419-426. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.
- [19] GONG Y Q, YANG J L, WANG Y, et al. Metabolic factors contribute to T-cell inhibition in the ovarian cancer ascites[J/OL]. *Int J Cancer*, 2020, 147(7): 1768-1777[2020-04-18]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ijc.32990>. DOI: 10.1002/ijc.32990.
- [20] BRUNO A, FERLAZZO G, ALBINI A, et al. A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis[J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(8): dju200[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4344546/>. DOI: 10.1093/jnci/dju200.
- [21] BACHANOVA V, MILLER J S. NK cells in therapy of cancer [J/OL]. *Crit Rev Oncog*, 2014, 19(1/2): 133-141[2020-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066212/>. DOI: 10.1615/critrevoncog.2014011091.

[收稿日期] 2020-04-21

[修回日期] 2020-08-31

[本文编辑] 党瑞山