

tilation with high tidal volume induces inflammation in patients without lung disease[J]. Crit Care, 2010, 14(2): R39.

[10] Schultz MJ. Lung-protective mechanical ventilation with lower tidal volumes in patients not suffering from acute lung injury: a review of clinical studies [J]. Med Sci Monit, 2008, 14(2): 22-26.

[11] Terragni PP, Del Sorbo L, Mascia L, et al. Tidal volume lower than 6 ml/kg enhances lung protection: role of extracorporeal carbon dioxide removal[J]. Anesthesiology, 2009, 111(4): 826-835.

[12] Gajic O, Dara SI, Mendez JL, et al. Ventilator-associated lung injury in patients without acute lung injury at the onset of mechanical ventilation[J]. Crit Care Med, 2004, 32(9): 1817-1824.

[13] Ragaller M, Richter T. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. J Emerg Trauma Shock,

2010, 3(1): 43-51.

[14] 陈淑萍, 于湘友. ALI/ARDS 患者机械通气时最佳 PEEP 选择的研究进展[J]. 中国呼吸与危重病监护杂志, 2009, 8(5): 512-513.

[15] 李燕飞. 机械通气救治重症创伤性湿肺并发 ARDS 41 例临床观察[J]. 右江民族医学院学报, 2009, 31(1): 44-45.

[16] Sud S, Sud M, Friedrich JO, et al. High frequency oscillation inpatients with AIL and ARDS: systematic review and meta-analysis[J]. BMJ, 2010, 340(182): 2327.

[17] 朱晓丹, 白春学. ALI/ARDS 发病机制及治疗研究进展 [J]. 中国急诊医学杂志, 2010, 19(10): 1111-1113.

[18] Suhail Raoof, Ksith Goulet, Adebayo Esan, et al. Severe Hypoxemic Respiratory Failure Part 2-Nonventilatory Strategies[J]. Chest, 2010, 137(6): 1437-1448.

(收稿日期: 2011-12-10)

细胞因子诱导的杀伤细胞体外研究及临床应用进展

梁顺嗣 综述, 娄世锋[△], 罗云 审校(重庆医科大学附属第二医院血液内科 400010)

【关键词】 杀伤细胞; 过继免疫治疗; 肿瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 14. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)14-1757-03

随着恶性肿瘤发病率逐渐升高, 对人类生命健康的威胁日趋严重, 传统的放化疗及手术治疗方式虽在治疗肿瘤方面取得了一定的进步, 但对于年龄较大及失去治疗机会的中晚期肿瘤患者却束手无策, 因此各种肿瘤生物治疗的新方法应运而生, 以细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)为代表的细胞过继免疫治疗即是其中一种。CIK 细胞由 Schmidt-Wolf 等^[1]于 1991 年首次报道, 是一种由外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子(IFN- γ 、抗 CD3 单克隆抗体及 IL-2)共同培养一段时间后获得的异质细胞群。该群细胞以 CD3⁺CD56⁺T 淋巴细胞为主要效应细胞, 具有 T 淋巴细胞的杀瘤活性和 NK(natural killer)细胞的非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀瘤优点。与其他免疫治疗细胞相比具有增殖速度快、抗瘤谱广、杀瘤活性高等优点, 故迅速成为了细胞免疫治疗的首选方案。现就 CIK 细胞的特点、杀瘤特性、临床应用等作一简要综述。

1 CIK 细胞的特点

1.1 CIK 细胞的制备 Schmidt-wolf 等^[1]提出的经典制备方法为: 从外周血分离制备单个核细胞悬液, 将细胞浓度控制为 10⁶/mL 进行培养, 加入 IFN- γ 1 000 U/mL 培养 24 h 后加入抗 CD3 单克隆抗体 50 ng/mL, 重组人白细胞介素-2(rhIL-2) 300 U/mL 和 rhIL-1 100 U/mL, 后每 3 天更换新鲜培养液和 IL-2, 并调整细胞浓度至 2 \times 10⁵/mL, 这样即可制备出 CIK 细胞, 培养 15 d 细胞数可增长 754 倍。有研究发现 CD3⁺CD56⁺细胞对于多种肿瘤细胞细胞毒活性强于 CD3⁺CD56⁻细胞^[2]。最近也有学者在经典方法上加入 IL-4 和 GM-CSF, 这样制备出来的 CIK 细胞扩增倍数明显提高^[3]。此外, Wang 等^[4]通过可诱导共刺激分子(ICOS)基因转染 CIK 细胞(CIK-ICOS)并观察其对胆囊癌细胞的细胞毒作用, 他们发现与普通 CIK 细胞相比 CIK-ICOS 对癌细胞的杀伤力显著提高, 其机理可能系

CIK-ICOS 细胞增加了 IFN- γ 等细胞因子的释放。这些为培养更高效毒活性的 CIK 细胞提供了新思路及新方法。

1.2 CIK 细胞来源 CIK 细胞输注首先要保证质量及数量, 应减少或避免传染疾病的机会, 常规的来源以自体外周血居多, 但也有学者对其他来源的 CIK 细胞进行了研究。

1.2.1 自体来源细胞 自体外周血避免了交叉感染的机会, 方便采集, 安全性亦得到提高。

1.2.2 骨髓来源细胞 骨髓来源的 CIK 细胞增殖活性较外周血稍差, 但仍具有相当高的增殖能力, 且在细胞毒方面与外周血 CIK 细胞相似^[5]。

1.2.3 脐血来源细胞 脐带血与外周血及骨髓相比来源更广泛, 且移植排斥反应小。有研究^[6]证实脐血 CIK 细胞较外周血增殖速度快, 杀伤活性强, 对肿瘤细胞的作用显著优于外周血 CIK 细胞。脐血 CIK 细胞以诱导肿瘤细胞坏死为主, 而外周血 CIK 细胞则以诱导肿瘤细胞凋亡为主。

1.2.4 异体来源细胞 异体细胞来源广泛, 但临床应用中增加了感染的机会及可能引起移植抗宿主病(GVHD)。

1.3 CIK 细胞免疫表型 CIK 细胞为一异质细胞群, 有研究表明这群细胞中只有 2% 表达 CD3⁻CD56⁺, 大于 90% 表达 CD3, 这其中包括 35% 表达 CD56 的细胞^[7]。潘春华和罗荣城^[8]利用流式细胞仪(FACS)检测 CIK 细胞表面 CD 分子表达情况, 显示其高表达 CD3、CD54、CD11a, 中表达 CD3CD56、HLA-DR、CD28CD54、CD28, 不表达 CD86 及 CD80。而主要效应细胞为 CD3 和 CD56 共表达细胞。

1.4 CIK 细胞的生物学特性

1.4.1 CIK 细胞增殖速度快 CIK 细胞来源于单个核细胞, 经过体外培养后 CD3⁺CD56⁺细胞能够大量扩增, 而在未培养的外周血中含量极少, 只有 1%~5%^[9]。在培养 2~3 周后,

[△] 通讯作者, E-mail: loushifeng@hotmail.com.

CIK 细胞比例可由 0.1%~0.13% 上升至 19%~20.5%，细胞数量平均增加 25 倍(2.2~525 倍)。与以往的淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)、抗 CD3 单克隆抗体激活的杀伤细胞(CD3AK)相比,其扩增能力及杀伤活性均有提高^[10]。

1.4.2 抗瘤谱广 CIK 细胞主要效应细胞为 CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞群,其既有 T 淋巴细胞的抗肿瘤特性,又有 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特点,对很多肿瘤均有杀伤活性,很多研究已证实了该活性,如对结肠癌 SW620 和 LOVO 细胞株;鼻咽癌 CNE-1、CNE-2Z、NP69 细胞株;肾癌 A704;宫颈癌、卵巢癌等,且对自体 and 异体肿瘤均有较好的抗瘤效果。

1.4.3 杀瘤活性高 现已有研究表明 CIK 细胞不仅以非 MHC 限制杀伤靶细胞,还以 MHC 限制的方式杀伤靶细胞,树突状细胞以 MHC 限制的方式呈递抗原给 CIK 细胞中的 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 淋巴细胞,使其中的细胞毒 T 淋巴细胞大量扩增,激活 CIK 细胞中的 MHC 限制性杀伤功能,从而在抗肿瘤免疫治疗中,清除残存的肿瘤细胞,发挥更强大的细胞毒作用,更有效地阻止或延缓肿瘤的复发^[11]。

2 CIK 细胞的杀瘤机制

有效杀伤肿瘤细胞是细胞免疫治疗的主要功能,CIK 细胞因其非 MHC 限制性特点,对实体肿瘤细胞及血液系统恶性肿瘤细胞均有抗瘤活性,但其识别和杀伤机制仍未完全阐明。以下几种方式已得到证实。

2.1 直接杀伤肿瘤细胞 可能与靶细胞表面分子和效应细胞表面相应受体结合有关。Mehta 等^[12] 发现两条途径释放细胞毒颗粒:第一为 CIK 细胞活化后通过黏附因子 LFA-1/ICAM-1 途径与靶细胞结合,此过程与细胞内 cAMP 浓度无关,并释放含 α-氮-甲苯碳酰基-左旋-赖氨酸硫甲苯酯(BLT)的毒性颗粒杀伤靶细胞。CIK 细胞为一异质细胞群,亦可分泌穿孔素(perforin)及颗粒酶(granzyme)杀伤靶细胞。而颗粒酶进入靶细胞需穿孔素的帮助,但具体机制不详。Keefe 等^[13] 认为穿孔素在靶细胞膜上形成通道,致使钙离子内流,引起细胞膜反应并对颗粒酶产生内吞作用而进入靶细胞内。颗粒酶系一高同源性丝氨酸蛋白酶家族,进入靶细胞后通过不同途径使细胞凋亡。颗粒酶 A 通过诱导非 caspase(半胱氨酸天冬氨酸酶)通路至细胞死亡。Martinvalet 等^[14] 用颗粒酶 A 和穿孔素杀伤靶细胞发现几分钟内靶细胞开始出现浆膜破坏,并且还观察到活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加,以及线粒体跨膜能力的丧失和线粒体形态的破坏等线粒体功能紊乱的证据。颗粒酶 B 则通过 caspase 途径,特别是 caspase-3 促使细胞凋亡。第二条途径则需要依赖 cAMP 浓度,由 CIK 细胞的 CD3 样受体介导,结果仍为释放胞浆毒性颗粒使细胞溶解。

2.2 细胞因子间接杀伤作用 CIK 细胞活化后可分泌多种细胞因子,如 IL-2、TNF-α、IFN-γ 等,不仅可直接杀伤肿瘤细胞,还可通过对机体免疫系统的调节来间接杀伤肿瘤细胞,Kornacder 等^[15] 用 CIK 细胞治疗慢性淋巴细胞白血病(CLL),CIK 细胞分泌 IFN-γ 并促使 CLL 细胞上的 ICAM-1 表达增加,有助于 CIK 细胞识别并与其结合,具有较强的抗肿瘤作用,减缓细胞增殖速度;细胞毒作用直接杀伤癌细胞;并诱导肿瘤细胞向正常细胞分化;增加 MHC-I 和 MHC-II 抗原的表达,从而提高效应细胞诱导的凋亡作用。

2.3 对靶细胞凋亡及坏死作用 CIK 细胞能活化靶细胞凋亡基因,使其凋亡。有研究发现 CIK 细胞表达凋亡配体 FasL,能诱导 Fas 阳性肿瘤细胞凋亡,但因其本身高水平表达 Bcl-2、Bcl-xL、survivin 等抗凋亡基因,故能抵抗表达凋亡相关因子配

体的肿瘤细胞诱导的凋亡。此外 CIK 细胞还表达 C-cFLIP 蛋白,能阻止 FADD(具有死亡结构域的 Fas 相关蛋白)/caspase-8 相互作用形成死亡诱导信号复合物,从而阻止其本身细胞凋亡信号的产生,故 CIK 细胞能发挥持久的杀瘤作用^[16]。

3 CIK 细胞的临床应用

作为肿瘤放疗及手术治疗的重要辅助手段,CIK 细胞有其自身的特点,其同时具有 T 淋巴细胞的抗肿瘤活性及 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特性,与 LAK 细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)相比具有更强的杀伤活性,亦不需要同肿瘤细胞接触才能增殖,易于大量获得,杀瘤谱广,且杀瘤活性不受环孢素 A、他克莫司等影响。因而临床用于肿瘤细胞的杀伤,清除肿瘤残余病灶,增强抗肿瘤免疫力等已初显成效。杨波等^[17] 研究了自体 CIK 联合 IL-2 治疗老年 B 细胞恶性淋巴瘤的疗效。9 位老年恶性 B 细胞淋巴瘤患者,7 例经 8 疗程治疗,2 例经 4 疗程治疗,结果显示所有患者耐受性好,无不良反应,检测外周血 CD3⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 所占比例增加,血浆 beta-2 MG 和 LDH 水平在 CIK 细胞输注后较输注前明显降低,淋巴瘤症状减轻,生活质量得到提高;最后 8 例 CR,1 例 VGPR 但死于急性大面积心肌梗死和淋巴瘤本病进展。该研究提示自体 CIK 细胞联合 IL-2 治疗老年性 B 细胞淋巴瘤是安全有效的。Niu Q^[18] 等对比了脐血 CIK 细胞联合二线化疗方案(CB-CIK+化疗联合组)与单纯二线化疗方案(化疗组)在一线方案治疗失败的晚期实体肿瘤的疗效。该临床试验将 40 例患者分为两组,分别为联合组和化疗组;其结果显示联合组与化疗组 ORR 分别为 30%和 15%,DCR 分别为 80%和 70%,疾病进展时间为 3.45 个月和 2.03 个月而平均生存时间分别为 11.17 个月和 7.52 个月,并且联合组 PFS 和 OS 均较化疗组长。将 146 例原发性肝癌患者分为肝动脉栓塞化疗(TACE)联合 CIK 组及单纯 TACE 组进行了疗效对比研究,结果发现联合组半年、1 年、2 年无进展生存率分别为 72.2%、40.4%、25.3%,单纯 TACE 组分别为 34.8%、7.7%、2.6%。两组中位疾病进展时间分别为 11 个月和 5 个月。联合组半年、1 年、2 年总生存率分别为 90.35%、71.9%、62.4%,单纯 TACE 组分别为 74.6%、42.8%、18.8%。两组中位生存期分别是 31 个月和 10 个月。联合 CIK 细胞免疫治疗能显著提高疗效,延长无进展生存及总生存期。Franceschetti 等^[19] 研究发现 CIK 细胞对白血病及 B 细胞、T 细胞淋巴瘤有广泛的杀瘤作用。此外,他们还认为 CIK 细胞有可能成为治疗脐血移植后的白血病复发的革命性方法。

异基因造血干细胞移植是根治血液系统恶性疾病行之有效的方法,但因为残留病灶的存在,移植后亦有可能复发。而 CIK 细胞强大的肿瘤杀伤活性及引起低发生率的 GVHD,成为了移植后复发治疗的新希望。Introna 等^[20] 做了异基因(供者)CIK 治疗异基因造血干细胞移植后复发病例的 I 期临床研究。移植后复发的 11 例患者入组,分别为 AML 4 例、HD 3 例、CMML 1 例、pre-B ALL 1 例、MDS 2 例。其中同胞间全相合移植 6 例,无关供者移植 5 例。经过反复输注异基因(供者)CIK 细胞治疗,其中输注过程患者耐受性好,未出现急慢性相关副反应。但 4 例患者出现急性 GVHD(I 至 II 级)。在最后一次 CIK 细胞输注后 30 d 有 2 例患者进展为慢性 GVHD。11 例患者总的疗效为 6 例患者疾病进展和死亡,1 例病情稳定,1 例血液学情况改善,3 例完全缓解。陈健等^[21] 报道了应用 CIK 细胞治疗 80 例肿瘤患者的近期疗效,其中肝癌 25 例、胃癌 8 例、肠癌 10 例、肺癌 24 例、乳腺癌 6 例、其他肿瘤 7 例。结果

显示,在 80 例接受治疗患者中,部分缓解+微效为 28 例(43%),KPS 评分提高 50 例、稳定 18 例、下降 5 例,有效率为 62.5%;治疗后的外周血单核细胞活性增加;4 期患者 CIK 细胞杀伤活性相似。很多研究表明,CIK 细胞回输后不良反应小,以发热为主,予对症治疗后可好转。其表明了 CIK 细胞过继免疫疗法作为肿瘤的重要辅助治疗手段,可提高不同肿瘤患者的生活质量,改善症状及延长生存期,提示了 CIK 细胞抗肿瘤谱广、杀瘤活性强、不良反应小等优点。

4 展 望

细胞免疫治疗方法在治疗肿瘤上取得的疗效在国内外已得到证实,且正逐步成为传统化疗及手术治疗方式后重要的治疗手段之一取得了令人鼓舞和前所未有的巨大成就。而 CIK 细胞凭借其自身的优点,迅速成为细胞免疫治疗中发展迅速且应用广泛的一种,已有很多基础及临床研究验证了其有效性。但其具体抗肿瘤作用机制尚未完全阐明及如何保证输注的安全性、如何提高 CIK 细胞的数量及免疫活性,与手术、化疗如何组合才能达到最佳疗效将是需要解决的问题。

参考文献

[1] Schmidt Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SC ID 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] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺ CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 1994, 153(4): 1687-1696.

[3] 邹征云,刘宝瑞,钱晓萍,等. 从 50ml 外周血中高效扩增 CIK 方法的探讨 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(7): 515-518.

[4] Wang J, He M, Shi W, et al. Inducible costimulator (ICOS) enhances the cytolytic activity of cytokine-induced killer cells against gallbladder cancer in vitro and in vivo [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(3): 244-250.

[5] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells; NK-like T cells with cytotoxic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9): 1457-1462.

[6] 王稼祥,郑树,刘秋亮,等. 不同来源 CIK 细胞的体外扩增和杀伤活性的比较 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(7): 616-618.

[7] Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts [J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(1): 78-86.

[8] 潘春华,罗荣城. CIK 细胞的表型分析及生物学活性研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(11): 1030-1032.

[9] 杨葳,徐铭宝. CIK 细胞治疗恶性肿瘤研究进展 [J]. *中国实用医药*, 2009, 29(4): 217-219.

[10] Ren H, Hu HT, Liu G, et al. Study of multi-directional derivation of cord blood mononuclear-cells and observation of Killing Activity to MGC-803 gastric cancer cell strain in vitro [J]. *Chinese-German J C Oncol*, 2006, 5(4): 245-249.

[11] Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, et al. Expansion of cytotoxic CD3⁺ CD56⁺ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(4): 216-222.

[12] Mehta BA, Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, 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.

[13] Keefe D, Shi L, Feske S, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis [J]. *Immunity*, 2005, 23(3): 249-262.

[14] Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis [J]. *Immunity*, 2005, 22(3): 355-370.

[15] Kornacker M, Moldenhauer G, Herbst M, et al. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon-gamma [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(6): 1377-1382.

[16] Thome SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy [J]. *Science*, 2006, 311(5768): 1780-1784.

[17] 杨波,卢学春,朱宏丽,等. 自体 CIK 细胞联合 IL-2 治疗老人 B 细胞性恶性淋巴瘤临床研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(5): 1244-1249.

[18] 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.

[19] Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative Proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38(9): 621-627.

[20] 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(7): 952-959.

[21] 陈健,李勤,闵敏,等. 细胞因子诱导杀伤细胞治疗恶性肿瘤的临床观察 [J]. *西南国防医药*, 2006, 16(2): 186-188.