

[22] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733.

[23] Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*, 2008, 14

(11): 1264-1270.

[24] Gao Q, Geng L, Kvalheim G, et al. Identification of cancer stem-like side population cells in ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Ultrastruct Pathol*, 2009, 33(4): 175-181.

(收稿日期:2012-07-13 退回日期:2012-11-27)

· 综述 ·

# CIK 细胞在肿瘤过继细胞治疗中的疗效评价

王文浩 李贵新 刘锦

**【摘要】** 细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞治疗是肿瘤治疗中重要的辅助治疗方法。研究表明,肿瘤患者经过 CIK 细胞治疗后外周血免疫细胞数量会发生变化,其中 T 淋巴细胞亚群、调节性 T 细胞变化较为明显,这可能成为评价 CIK 细胞治疗疗效的标准之一。

**【关键词】** 肿瘤; CIK 细胞; 免疫反应

**Assessment of CIK cells in adoptive cellular therapy** WANG Wen-hao\*, LI Gui-xin, LIU Jin.\* Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Corresponding author: LI Gui-xin, E-mail: liguixin@wfm. edu. cn

**【Abstract】** Cytokine-induced killer (CIK) cells therapy plays an important role in cancer adjuvant treatment. Researches show that the number of peripheral blood immunocytes will change if patients with cancer accept the treatment of CIK cells. The changes of T cell subsets, regulatory T cells are relatively obvious, which may be one of the standards that can evaluate the curative effect of CIK cells.

**【Key words】** Neoplasms; Cytokine-induced killer cells; Immune response

细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是由多种细胞因子如白细胞介素(IL)-2、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和 CD3 单克隆抗体等诱导而成的对多种肿瘤具有杀伤活性的细胞毒性 T 细胞,其溶瘤活性具有非主要组织相容性复合体(MHC)限制性,并可调节和增强机体的免疫功能。CIK 细胞作为一种新型高效的免疫活性细胞在过继性细胞免疫治疗中得到广泛应用<sup>[1]</sup>。因此,CIK 细胞作为一种新兴肿瘤治疗方法已应用于临床,可对疗效进行合理评价,对肿瘤过继免疫治疗的发展和临床应用有重要意义。

## 1 CIK 细胞的免疫生物学特性

### 1.1 杀瘤活性强

CIK 细胞是以 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> T 细胞为主的异质细胞群,因 CIK 细胞在培养过程中 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 效应

细胞增长迅速,故 CIK 细胞的总杀伤单位(TLU)为淋巴因子激活杀伤(lymphokine-activated killer, LAK)细胞的 73 倍甚至更高<sup>[2]</sup>。通过对 CIK 细胞的表面标志研究发现,CIK 细胞为 CD3、CD56 双阳性细胞群,这些 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CIK 细胞主要来源于 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> 的 T 淋巴细胞,CIK 细胞的另一重要来源是 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞群。这种双阳性 T 细胞按细胞受体(TCR)的不同,进一步可分为 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T 细胞和 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T 细胞两种亚群。

### 1.2 增殖能力强

实验证明,CIK 细胞在培养过程中加入 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、抗 CD3、McAb、IL-2 等多因子后,细胞增殖速度迅速加快,远超过 LAK 细胞。在培养第 22 天增殖曲线达顶峰,约增加 100 倍,其中 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞不仅绝对数量增加 1000 倍以上,且所占百分比也大幅上升,培养至 28 ~ 30 d 时达平台期,细胞毒活性也达峰值<sup>[3]</sup>。

### 1.3 CD 分子表达多样性

实验表明<sup>[4-5]</sup>,从外周血分离淋巴细胞经过 IL-2、

IFN- $\gamma$  和 CD3 诱导并培养获得大量的 CIK 细胞, FACS 测定 CIK 表面 CD3CD56、CD3、CD54、人类白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)、CD11a、CD28、CD86、CD80 等 CD 分子表达情况及其百分率。结果表明, CIK 细胞高表达 CD3、CD54、CD11a, 中表达 CD3CD56、HLA-DR、CD28, 不表达 CD86、CD80, 且具有较强的增殖能力及非 MHC 限制性杀瘤活性。吴燕峰等实验表明, CD27 在 CIK 和自然杀伤(natural killer, NK) 细胞上均于培养的第 2 周达到最高峰, 但之后逐步下降, 在培养第 4 周降至 30% 左右的水平。CD28 在 CIK 和 NK 细胞上分别是在第 3 周和第 2 周时达到表达的最高峰, 之后迅速下降, 在培养第 4 周已经几乎消失。根据 CD27 和 CD28 在 CIK/NK 细胞上的表达变化规律, CIK/NK 细胞的收获时机以培养第 3 周为宜<sup>[6-7]</sup>。还有实验表明 CD137mAb 介导的共刺激信号可以促进 CIK 细胞的体外增殖活性, 并增强 CIK 细胞体外抗瘤作用。其中 CD137-CIK 组 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞的比例及其 IFN- $\gamma$  表达显著提高, 这可能是 CD137 信号增强 CIK 抗瘤作用的重要原因。

## 2 肿瘤过继细胞治疗疗效评价标准

肿瘤过继细胞治疗所产生的抗肿瘤活性是通过诱导肿瘤专一的免疫反应或通过改变患者的免疫进程来实现的, 所产生的临床效应与传统的化学治疗所产生的临床效应有较多差别。近期世界肿瘤疫苗协作组与国际肿瘤生物治疗协会组织多名肿瘤学家、免疫学家, 制定形成了一个“免疫相关反应评价标准(immu-ne-related response criteria, irRC)”<sup>[8]</sup>: ①明显可测的抗肿瘤活性, 免疫治疗要比细胞毒性治疗需要更久的时间; ②免疫治疗有效反应可能会出现在传统疾病进展(PD)之后; ③中断免疫治疗在某些情况下是不合适的, 除非能确证是 PD; ④PD 被建议改为临床无显著性疗效; ⑤持久疾病稳定(SD)或许表明抗肿瘤疗效。irRC 的出台对 CIK 细胞治疗的评价有积极意义, 通过对免疫反应指标的测定来确定免疫治疗有效反应时间及评价治疗疗效。

## 3 CIK 细胞免疫反应评价方法

目前已建立了多种用于检测患者免疫反应的方法<sup>[9]</sup>, 主要分为特异性和非特异性免疫反应两类方法。特异性免疫反应监测方法主要包括: 以迟发型超敏反应法检测治疗后患者体内是否存在抗原特异性 T 细胞<sup>[10]</sup>; ELISPOT 和 MHC-肽复合物四聚体法检测特异性 T 细胞数量<sup>[11]</sup>; 此外, 还可通过检测外周血淋巴细胞的体外杀伤活性检测抗原特异性 T 细胞的功能。非特异性免疫反应的检测方法包括: 流式细胞术

检测外周血淋巴细胞亚群, 酶联免疫吸附试验或流式微球分析法检测血清细胞因子分泌水平等。目前, 外周血淋巴细胞亚群在 CIK 细胞临床治疗中已得到广泛应用。

## 4 CIK 治疗后外周血免疫细胞的变化

### 4.1 T 淋巴细胞亚群变化情况

采用流式细胞仪对肾癌患者行 CIK 细胞治疗后的免疫指标研究表明, CIK 细胞治疗组于 CIK 细胞治疗后 2 周, 外周血 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值较治疗前升高, 并随时间推移继续升高, 高峰时间段主要在治疗后 2~4 周, 此后, 患者免疫功能逐渐回落, 于 CIK 细胞治疗后 8 周, 外周血 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞、NK 细胞及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值回落至较低水平, 但其指标仍高于常规治疗组<sup>[12]</sup>。结直肠癌患者治疗后的研究表明, CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 均显著高于治疗前, 且 CD8<sup>+</sup> 显著低于对照组<sup>[13]</sup>。对乳腺癌患者的研究表明, 接受 CIK 细胞治疗 1 个周期后乳腺癌患者外周血中的 CD3<sup>+</sup> 细胞、CD4<sup>+</sup> 细胞、NK 细胞数量与接受治疗前相比均有较明显的提高, 而 CD8<sup>+</sup> 细胞的数量与接受治疗前相比没有较明显的改变<sup>[14]</sup>。由此可见, 肿瘤患者在应用 CIK 细胞治疗后 T 淋巴细胞亚群变化基本一致, CIK 细胞对肿瘤患者的细胞免疫功能具有明显改善作用。

### 4.2 Treg 细胞变化情况

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的一个重要亚群, 一般占人外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 5%~10%<sup>[15-16]</sup>。具有免疫抑制性和免疫无能两大功能特征。其作用机制可能是通过细胞间直接接触和分泌抑制性细胞因子。在维持机体免疫内环境稳定、防止自身免疫性疾病发生、诱导移植耐受等方面都起重要作用。实验研究表明肿瘤患者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞比例明显高于对照组。经 CIK 细胞治疗后, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞比例降低, 与治疗前比较差异有统计学意义, 但治疗后 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞比例仍高于对照组, 且差异有统计学意义<sup>[17]</sup>。可推断降低肿瘤患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞水平是 CIK 体细胞治疗发挥作用的途径之一。

## 5 免疫反应指标的临床应用

陈复兴等报道了应用 CIK 细胞治疗 63 例肿瘤患者的近期疗效, 其中肝癌 15 例, 骨癌 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 I~IV 期。结果显示, 在 63 例接受治疗者中, 部分缓解(PR)和微效(MR)共 28 例(44.45%);

20 例癌胚抗原增高者治疗后有 14 例减低;10 例甲胎蛋白增高者,治疗后有 9 例减低。 $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞绝对值在 CIK 细胞治疗后增加 45% 以上;细胞过继免疫疗法能明显提高癌症患者免疫功能,改善临床症状,延长生存期,且无不良反应。有研究观察 CIK 细胞治疗前后肿瘤患者外周血 T 淋巴细胞亚群,证实肿瘤患者的免疫功能低下,CIK 细胞治疗能够提高机体的免疫功能<sup>[18]</sup>。现阶段 T 淋巴细胞亚群的测定在判断临床疗效中起到肯定作用,其他敏感指标的确定将有助于更加准确判定 CIK 细胞的疗效。

## 6 结语

CIK 细胞免疫治疗中一个重要问题就是寻找恰当的判定疗效的指标,国内外专家一直在讨论研究,套用传统肿瘤治疗疗效评价体系去评价肿瘤过继免疫治疗这一新兴肿瘤治疗方法是否具有合理性。尽管免疫反应指标作为 CIK 细胞治疗的评价标准有着广阔的研究前景,但还存在很多有待解决的问题,需要更加深入的探索和多方面的研究。免疫反应指标的研究对于肿瘤过继细胞治疗的发展和临床应用具有重要意义。相信随着对 CIK 细胞疗效评价标准研究的深入,CIK 细胞临床应用将更加广泛,从而使更多肿瘤患者受益。

## 参 考 文 献

- [1] Couzin-Frankel J. Immune therapy steps up the attack. *Science*, 2010, 330(6003): 440-443.
- [2] Hui D, Qiang L, Jian W, et al. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(1): 36-41.
- [3] Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(11): 1679-1687.
- [4] Powell DJ Jr, Dudley ME, Robbins PF, et al. Transition of late-stage effector T cell to  $CD27^+$   $CD28^+$  tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood*, 2005, 105(1): 241-250.
- [5] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 503-510.
- [6] Fu GF, Chen X, Hu HY, et al. Emergence of peripheral  $CD3^+$   $CD56^+$  cytokine-induced killer cell in HIV-1-infected Chinese children. *Int Immunol*, 2012, 24(3): 197-206.
- [7] Kapina MA, Shepelkova GS, Mischenko VV, et al.  $CD27$  low  $CD4$  T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from  $CD27$  high precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection. *J Immunol*, 2007, 178(2): 976-985.
- [8] Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7412-7420.
- [9] Zaki SA. Detection of human parvovirus B19 in cancer patients using ELISA and real-time PCR. *Indian J Med Microbiol*, 2012, 30(4): 407-410.
- [10] Sato Y, Shomura H, Maeda Y, et al. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci*, 2003, 94(9): 802-808.
- [11] Hobeika AC, Morse MA, Osada T, et al. Enumerating antigen-specific T-cell responses in peripheral blood: a comparison of peptide MHC Tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis. *J Immunother*, 2005, 28(1): 63-72.
- [12] Su X, Zhang L, Jin L, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(4): 465-470.
- [13] Petvises S, Pakakasama S, Wongkajornsilp A, et al. Ex vivo generation of cytokine-induced killer cells ( $CD3^+$   $CD56^+$ ) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Pediatr Transplant*, 2007, 11(5): 511-517.
- [14] Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated  $CD8$  cytotoxic T-EMRA lymphocytes. *Exp Hematol*, 2009, 37(5): 616-628.
- [15] Li H, Yu JP, Cao S, et al.  $CD4^+$   $CD25^+$  regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients. *J Clin Immunol*, 2007, 27(3): 317-326.
- [16] 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. *Exp Hematol*, 2011, 39(9): 897-903.
- [17] 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 undergoing minimally invasive therapy. *Chin J Cancer*, 2010, 29(6): 596-602.
- [18] Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, et al. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 486-494.

(收稿日期:2012-11-23 修回日期:2012-12-25)