

·肿瘤介入 Tumor intervention·

动脉化疗栓塞联合 CIK 细胞过继免疫治疗 对中晚期肝癌患者免疫功能的影响

杨 茂, 郭 志, 司同国, 邢文阁, 刘 方, 李保国, 于海鹏

【摘要】 目的 分析肝动脉化疗栓塞(TACE)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)过继免疫治疗对中晚期肝癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的影响及临床意义。**方法** 回顾天津肿瘤医院 136 例中晚期原发性肝癌患者(均为 TACE 术后, 经影像学检查显示无远处转移)资料, 依据治疗方式分为两组: TACE 联合 CIK 治疗 67 例为研究组, 单纯 TACE 治疗 69 例为对照组。分别于治疗前、治疗后相同时间点取外周血, 测定 AFP、T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞计数变化; 术后 1 个月采用增强 CT、MRI 或 PET-CT 评价肿瘤坏死程度。**结果** 研究组与对照组近期疗效及 AFP 下降率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组治疗前后比较, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、NK 细胞比率及 $CD4^+/CD8^+$ 分别由 $(50.26 \pm 6.37)\%$ 、 $(53.20 \pm 9.29)\%$ 、 $(21.03 \pm 8.58)\%$ 、 1.58 ± 0.43 下降至 $(48.95 \pm 8.83)\%$ ($P > 0.05$)、 $(50.09 \pm 9.99)\%$ ($P < 0.01$)、 $(19.63 \pm 8.42)\%$ ($P > 0.05$)、 1.44 ± 0.52 ($P < 0.01$)。研究组治疗前后比较, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、NK 细胞比率及 $CD4^+/CD8^+$ 分别由 $(50.51 \pm 12.37)\%$ 、 $(52.48 \pm 15.55)\%$ 、 $(20.67 \pm 10.92)\%$ 、 1.76 ± 0.90 上升至 $(53.62 \pm 11.37)\%$ ($P < 0.01$)、 $(55.62 \pm 14.63)\%$ ($P < 0.05$)、 $(23.23 \pm 10.37)\%$ ($P < 0.01$)、 1.94 ± 0.84 ($P < 0.01$)。研究组与对照组比较, $CD8^+$ 、Treg 细胞比率分别由 $(35.70 \pm 8.71)\%$ 、 $(6.55 \pm 1.47)\%$ 上升至 $(38.04 \pm 10.50)\%$ ($P < 0.05$)、 $(6.76 \pm 1.67)\%$ ($P > 0.05$)。研究组治疗前后比较, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、NK 细胞比率及 $CD4^+/CD8^+$ 分别由 $(50.51 \pm 12.37)\%$ 、 $(52.48 \pm 15.55)\%$ 、 $(20.67 \pm 10.92)\%$ 、 1.76 ± 0.90 上升至 $(53.62 \pm 11.37)\%$ ($P < 0.01$)、 $(55.62 \pm 14.63)\%$ ($P < 0.05$)、 $(23.23 \pm 10.37)\%$ ($P < 0.01$)、 1.94 ± 0.84 ($P < 0.01$)。研究组与对照组比较, $CD8^+$ 、Treg 细胞比率分别由 $(35.61 \pm 12.90)\%$ 、 $(6.57 \pm 4.88)\%$ 下降至 $(32.68 \pm 10.56)\%$ ($P < 0.05$)、 $(4.77 \pm 1.99)\%$ ($P < 0.01$)。**结论** TACE 术后联合 CIK 细胞过继性免疫治疗可以改善患者免疫状态, 提高机体的抗肿瘤免疫效应, 有可能降低中晚期 HCC 患者 TACE 术后的复发和转移机会。

【关键词】 原发性肝细胞癌; 细胞因子诱导杀伤细胞; T 淋巴细胞亚群; NK 细胞; $CD4^+CD25^+$ 调节 T 细胞(Treg 细胞)

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2011)-02-0116-04

Influence of transcatheter arterial chemoembolization combined with cytokine-induced killer cell on the immune function in patients with advanced primary hepatocellular carcinoma YANG Mao, GUO Zhi, SI Tong-guo, XING Wen-ge, LIU Fang, LI Bao-guo, YU Hai-peng. Department of Interventional Therapy, Cancer Institute and Affiliated Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China. Corresponding author: GUO Zhi, E-mail: guozh@vip.163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of TACE and autologous cytokine-induced killer (CIK) cells on the peripheral T lymphocyte subsets and native killer cell in patients with advanced primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 136 patients with unresectable HCC were divided into study group ($n = 67$, patients were treated with CIK cell therapy after TACE), and control group ($n = 69$, patients were treated with TACE only). The serum levels of AFP, T lymphocyte subsets and native killer (NK) cell in peripheral blood of HCC patients were determined before and after the treatment. Tumor condition was observed by CT, MRI or PET-CT one month after the treatment. **Results** No significant difference in serum AFP level decrease and therapeutic effectiveness existed between two groups ($P > 0.05$). In the control group, the percentages of $CD3^+$, $CD4^+$, NK cells and the proportion of $CD4^+/CD8^+$ decreased from $(50.26 \pm 6.37)\%$, $(53.20 \pm 9.29)\%$, $(21.03 \pm 8.58)\%$, 1.58 ± 0.43 to $(48.95 \pm 8.83)\%$ ($P > 0.05$), $(50.09 \pm 9.99)\%$ ($P < 0.01$), $(19.63 \pm 8.42)\%$ ($P > 0.05$), 1.44 ± 0.52 ($P < 0.01$) respectively, while $CD8^+$ and Treg cells increased from $(35.70 \pm 8.71)\%$, $(6.55 \pm 1.47)\%$ to $(38.04 \pm 10.50)\%$ ($P < 0.05$), $(6.76 \pm 1.67)\%$ ($P > 0.05$).

基金项目: 国家科技支撑计划课题资助项目(编号: 2007BAI05B06)

作者单位: 300060 天津医科大学附属天津肿瘤医院
院肿瘤介入治疗科 天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者: 郭 志 E-mail: guozh@vip.163.com

$(50.09 \pm 9.99)\%$ ($P < 0.01$), $(19.63 \pm 8.42)\%$ ($P > 0.05$), 1.44 ± 0.52 ($P < 0.01$) respectively, while $CD8^+$ and Treg cells increased from $(35.70 \pm 8.71)\%$, $(6.55 \pm 1.47)\%$ to $(38.04 \pm 10.50)\%$ ($P < 0.05$), $(6.76 \pm 1.67)\%$ ($P > 0.05$).

respectively. In the study group, the percentages of CD3⁺, CD4⁺, NK cells and the proportion of CD4⁺/CD8⁺ increased from (50.51 ± 12.37)%, (52.48 ± 15.55)%, (20.67 ± 10.92)%, 1.76 ± 0.90 respectively to (53.62 ± 11.37)%(*P* < 0.01), (55.62 ± 14.63)%(*P* < 0.05), (23.23 ± 10.37)%(*P* < 0.01), 1.94 ± 0.84 (*P* < 0.01) respectively, while CD8⁺ and Treg cells decreased from (35.61 ± 12.90)%, (6.57 ± 4.88)% to (32.68 ± 10.56)%(*P* < 0.05), (4.77 ± 1.99)%(*P* < 0.01) respectively. **Conclusion** Autologous CIK cells transfusion after TACE can efficiently improve the immunological status in HCC patients, moreover, it may provide a potent means to reduce the recurrence rate of HCC. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 116-119)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; cytokine-induced killer cell; T lymphocyte subset; native killer cell; CD4⁺CD25⁺Treg cells

原发性肝细胞癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一。由于病程发展快,患者就诊时多属中晚期,仅有 30% ~ 40%的患者可以进行手术切除。对于无手术指征的 HCC,治疗上首选 TACE。单一 TACE 不能从根本上完全去除肿瘤,术后仍有相当部分癌灶残存,越来越多的学者认识到对 HCC 采用综合介入治疗的优越性。过继免疫治疗适用于免疫功能低下的肿瘤患者,可防治复发和转移,作为 TACE 术后有效的补充疗法。本课题着重研究 TACE 联合细胞因子诱发杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)过继免疫治疗对中晚期肝癌患者免疫功能的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 我科从 2005 年 1 月至 2009 年 12 月收治的经病理或临床证实且病例资料完整的不能手术切除的 HCC 136 例,肿块最大直径为 4 ~ 13 cm,无远处转移,肝功能为 Child-Pugh A 或 B 级,ECOG 评分小于 2 分。按照治疗方法分组:67 例 TACE 联合 CIK 细胞过继免疫治疗作为研究组,另 69 例单纯经 TACE 治疗为对照组,两组病例一般状况具可比性(见表 1)。两组病例均排除合并免疫系统或感染性疾病;治疗前 60 d 均未接受过放化疗或影响免疫功能药物。

1.1.2 仪器和主要试剂 东芝数字减影机(DEP-22000A 型);FACS Aria™ 流式细胞仪(美国 BD 公司产品);流式细胞抗体包括:CD4⁺PerCP 单克隆抗体、CD25⁺FITC 单克隆抗体、CD127-PE 单克隆抗体、Thi1TESTCD3-FITC/CD16⁺CD56-PE/CD45-PerCP 单克隆抗体、Thi1T2ESTCD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP 单克隆抗体(均为美国 BD 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 TACE 采用 Seldinger 技术,经皮股动脉穿刺,导管选择至肿瘤供血动脉行 DSA 造影,根据肿

表 1 两组患者基本情况

参数	研究组	对照组
例数	67	69
年龄		
< 60 岁(例)	45	50
> 60 岁(例)	22	19
中位年龄(岁)	56	57
性别		
男(例)	58	56
女(例)	9	13
血清 AFP(例)		
< 400 ng/ml	49	54
> 400 ng/ml	18	15
Child-Pugh 分级(例)		
A	58	55
B	9	14
病源(例)		
HBV/HCV	40	47
不明	27	22

两组比较 *P* 均 > 0.05

瘤血供情况进行栓塞。所有患者进行 TACE 治疗。TACE 治疗方案为 5-Fu 750 ~ 1 000 mg、DDP 40 ~ 80 mg、MMC 20 mg 或 EADM 40 ~ 60 mg 加超液化碘油 5 ~ 20 ml。每 4 周治疗 1 次,连续 4 次为 1 疗程。

1.2.2 CIK 细胞制备 患者外周富集血经 Ficoll 分离液分离单个核细胞,用含 10%人 AB 型血清的 1640 培养液调整细胞浓度为(1 ~ 3) × 10⁶/ml,培养第 1 天加入抗 CD3 单抗 100 ng/ml、人重组 IL-1α 100 u/ml、人重组 IFN-γ 1 000 u/ml,培养第 2 天加入人重组 IL-2 300 u/ml,每 3 天更换新鲜培养液,同时添加补充人重组 IL-2 和人重组 IFN-γ,培养 12 ~ 14 d 收获 CIK 细胞。

1.2.3 CIK 细胞的回输 治疗组在行 TACE 当天,将 CIK 细胞悬液按 Seldinger 法在 DSA 下经肝总动脉灌注给研究组患者,每次回输的细胞数量为 1.6 × 10⁹ ~ 16 × 10⁹,30 min 内回输完毕。第 2 天再次静脉回输同等条件培养的 CIK 细胞。每 4 周 1 次,连续 4 次为一疗程。对照组不予 CIK 细胞免疫治疗。

1.2.4 免疫指标的检测 检测治疗前 1 周及 1 个

疗程后患者外周血 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、Treg)和 NK 细胞水平变化。

1.2.5 随访 研究组与对照组复查血浆 AFP 及腹部 CT、MRI 或 PET-CT,评价肿瘤标志物及肿瘤大小变化。

1.2.6 统计学方法 研究组及对照组治疗前后 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比率均以平均数 ± 标准差表示,用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,实验设计为自身配对均数的 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义;近期疗效评价有效率及 AFP 下降率采用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近期疗效

2.1.1 两组疗效比较 疗效评价根据 CT、MRI 或 PET-CT 检查,确定肿瘤缩小的程度,根据 WHO 实体肿瘤疗效评价标准进行疗效判定:分为完全缓解(CR),部分缓解(PR),疾病稳定(SD),疾病进展(PD);客观有效率为 CR + PR。研究组 67 例中 CR, PR, SD 和 PD 分别为 3, 43, 13 和 8 例;对照组分别

为 1, 38, 19 和 11 例。对照组有效率为 56.5%(39/69),研究组有效率为 68.7%(45/67)。研究组的有效率高于对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.1.2 血清 AFP 下降情况 术后复查 AFP,并与治疗前比较。对照组 69 例中血清 AFP 异常者 45 例,45 例经治疗降幅超过 50%者 16 例,降幅未超过 50%者 13 例,均未降至正常;研究组 67 例中血清 AFP 异常者 48 例,48 例经治疗降幅超过 50%者 20 例,降幅未超过 50%者 15 例,其中降至正常 1 例。研究组 AFP 下降率 72.9%(35/48) 高于对照组 64.4%(29/45),但两组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2.2 治疗前后外周血中 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的变化

对照组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、NK 细胞的比率和 CD4⁺/CD8⁺比值下降,CD8⁺和 Treg 细胞比率上升,其中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺变化具有统计学意义,而 CD3⁺、NK、Treg 变化不具有统计学意义;研究组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、NK 细胞的比率和 CD4⁺/CD8⁺比值上升,CD8⁺和 Treg 细胞比率下降,均具有统计学意义(表 2)。

表 2 两组治疗前后 T 淋巴亚群及 NK 细胞变化

组别	时间	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg	NK
研究组	治疗前	50.51 ± 12.37	52.48 ± 15.55	35.61 ± 12.90	1.76 ± 0.90	6.57 ± 4.88	20.67 ± 10.92
	治疗后	53.62 ± 11.37	55.62 ± 14.63	32.68 ± 10.56	1.94 ± 0.84	4.77 ± 1.99	23.23 ± 10.37
	<i>t</i> 值	4.183	2.354	3.062	2.357	2.869	3.358
	<i>P</i> 值	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01
对照组	治疗前	50.26 ± 6.37	53.20 ± 9.29	35.70 ± 8.71	1.58 ± 0.43	6.55 ± 1.47	21.03 ± 8.58
	治疗后	48.95 ± 8.83	50.09 ± 9.99	38.04 ± 10.50	1.44 ± 0.52	6.76 ± 1.67	19.63 ± 8.42
	<i>t</i> 值	1.349	2.877	2.468	2.749	1.166	1.544
	<i>P</i> 值	> 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.01	> 0.05	> 0.05

2.3 不良反应 两组患者术后共有 84 例出现疼痛、发热等反应,对症处理后逐渐缓解。术后均予抗炎、保肝治疗,均无感染、肝肾功能损害加重。

3 讨论

TACE 是 HCC 非手术治疗的首选治疗方法^[1],可以显著提高患者的 2 年生存率。但 TACE 对肝内微小病灶作用有限,这是导致 HCC 复发及转移的主要原因。这一病理现象与患者的免疫系统功能低下及免疫抑制有密切关系。我国 HCC 的主要病因是乙型肝炎病毒慢性感染,患者均存在不同程度的免疫功能缺陷^[2-3],表现为 CD3⁺、CD4⁺比率降低,CD8⁺比率增高,CD4⁺/CD8⁺比值下降。另有研究报道,HCC 患者经 TACE 治疗增加肺转移的概率^[4]。本组研究结果显示:对照组经单纯 TACE 治疗后,

CD4⁺比率下降,CD8⁺比率上升,CD4⁺/CD8⁺比值下降,具有统计学意义,其细胞免疫功能低下表现更为明显。但 CD3⁺、NK 以及 Treg 细胞变化不具有统计学意义,说明机体的细胞免疫功能在 TACE 术后一定程度上受到抑制,可能与化疗药物导致免疫功能下降有关。因此,TACE 后如何改善患者免疫抑制状态,进一步防止肿瘤的复发及转移显得尤为重要。

CIK 细胞来源于外周血中的单核细胞,对肿瘤细胞的杀伤作用具有高效和广谱抗肿瘤的特点,是目前过继免疫治疗的有效方法之一。其抗肿瘤作用的主要机制包括直接杀伤肿瘤细胞及促进 T 淋巴细胞增殖活化等。研究表明 CIK 细胞能抑制肝癌细胞生长,提高机体免疫功能,清除肿瘤患者体内微小残余病灶,从而防止复发^[5-6]。Takayama 等^[7]证实对根治性切除术后肝癌患者进行过继细胞免疫治

疗能降低肝癌的复发率。本研究把肝癌的 TACE 治疗与 CIK 细胞过继免疫治疗结合起来。从临床疗效评价可以看出,研究组的近期有效率 71.6% 较对照组 62.3% 高,与徐永茂等^[8]报道的 CIK 联合介入和单纯介入治疗近期有效率相近;研究组 AFP 下降率 72.9% (35/48) 较对照组 64.4% (29/45) 高。虽然两组数据差异无统计学意义,但显现了 TACE 联合 CIK 细胞可在一定程度上提高临床近期有效率。

在肿瘤细胞免疫中,T 淋巴细胞和 NK 细胞在免疫监视、杀伤靶细胞及免疫调节方面起关键作用,这些细胞的变化反映了机体免疫功能的改变。CD4⁺细胞为辅助性 T 细胞,辅助机体完成抗肿瘤免疫,在协同清除、消灭肿瘤细胞方面有重要作用,CD4⁺细胞减少可使肿瘤细胞发生免疫逃逸;CD8⁺细胞增多是引起细胞免疫损害的基础,这种损害可通过 CD4⁺/CD8⁺比值得到灵敏的反映。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞是近年发现的一种新型免疫抑制细胞,具有免疫无能和免疫抑制两大特征^[9],多个实体肿瘤的临床研究表明,Treg 细胞比率的升高与肿瘤的发生、发展密切相关,对机体的抗肿瘤免疫反应起负向调节作用^[10-12]。通过各种途径降低 Treg 细胞比率或者下调其活性,可显著改善机体抗肿瘤免疫状态,有助于降低肿瘤的复发和转移^[13]。NK 细胞是机体免疫防御体系的第一道防线,可直接发挥抗肿瘤效应,并发挥免疫监视作用,通过分泌细胞因子来调节免疫应答,在控制肿瘤转移的早期起主要作用^[14]。本组研究结果显示,研究组回输 CIK 细胞后,CD3⁺、CD4⁺、NK 比率和 CD4⁺/CD8⁺比值上升,CD8⁺、Treg 比率下降,均具有统计学意义,反映了机体免疫功能得到改善,使肿瘤细胞对机体的免疫抑制减弱,增强了抗肿瘤的能力,对抑制肿瘤的复发和转移起到重要的作用。

总之,TACE 联合 CIK 细胞治疗中晚期 HCC 体现了局部与全身治疗相结合的综合治疗理念。TACE 可降低局部肿瘤负荷,但同时会对机体的免疫功能造成一定损害;联合 CIK 细胞治疗进一步清除残留的微小病灶,又可以改善机体免疫抑制状态,增强其抗肿瘤免疫功能,从而防止肿瘤复发。本研究结果显示,TACE 术后行 CIK 细胞过继免疫治疗,可以在短时间内提高机体的抗肿瘤免疫能力,但长期疗效有待进一步证实。

[参考文献]

- [1] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008[J]. J Hepatol, 2008, 48: 20 - 37.
- [2] 郭志,邢文阁,刘方,等. 氩氦冷冻在原发巨块状肝癌介入治疗中的临床应用[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39: 198 - 203.
- [3] Ladhams A, Schmidt C, Sing G, et al. Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17: 889 - 896.
- [4] Lin SC, Shih SC, Kao CR, et al. Transcatheter arterial embolization treatment in patients with hepatocellular carcinoma and risk of pulmonary metastasis [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1208 - 1211.
- [5] Wang FS, Liu MX, Zhang B, et al. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8: 464 - 468.
- [6] 施明,张冰,汤紫荣,等. 肝癌患者自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗后免疫活性细胞的检测及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2003, 83: 2049 - 2053.
- [7] Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial[J]. Lancet, 2000, 356: 802 - 807.
- [8] 徐永茂,张南征,张国龙,等. 双介入联合 CIK 细胞治疗中晚期肝癌[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12: 1288 - 1291.
- [9] Shimizu S, Yamazaki T, Takahashi Y, et al. Stimulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance[J]. Nat Immunol, 2005, 3: 135 - 142.
- [10] Sakaguchi S. Natural arising CD4⁺ regulatory cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses[J]. Ann Rev Immunol, 2004, 22: 531 - 562.
- [11] Liu L, Wu G, Yao JX, et al. CD4⁺CD25⁺ high regulatory cells in peripheral blood of cancer patients [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2008, 29: 240 - 245.
- [12] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55: 1064 - 1071.
- [13] Imai H, Saio M, Nonaka K, et al. Deletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells enhance interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98: 416 - 423.
- [14] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by NK and NKT cells[J]. J Exp Med, 2000, 191: 661 - 668.

(收稿日期:2010-08-13)