

# NK 细胞治疗肝脏恶性肿瘤疗效评价的安全性及有效性

李莉 周丰 王晓今 徐以兵 施莉琴 李震宇 周桁 傅青春 陈成伟

**【摘要】** 目的 观察 NK 细胞过继回输治疗肝脏恶性肿瘤的安全性及有效性。方法 选择 10 例经手术切除、肝动脉介入、微波消融或放疗后的肝恶性肿瘤患者,回输其直系亲属来源体外培养的 NK 细胞。通过观察患者异体 NK 细胞过继回输后反应、比较治疗前后生活质量(KPS 评分)、肝肾功能、血常规、循环肿瘤细胞(CTC)、有效缓解率、总体生存率等指标变化,评价该治疗方法的安全性和近期疗效。结果 异体 NK 细胞回输后,1 例患者细胞输注后半小时出现畏寒、寒战、胸闷,给予对症处理,15 min 后症状缓解体温升高,最高至 39.9℃,伴恶心、呕吐,予以胃复安及泰诺处理后,症状逐渐消失,次日有轻度肌肉酸痛;1 例出现失眠;5 例患者的精神、食欲、体力明显好转。10 例患者输注后 24 h CTC 数由 3~5/mL 降至 1~3/mL,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肝、肾功能均无明显变化。随访 3~36 个月,根据实体瘤疗效评价标准,患者 3 个月总体生存率 100%,有效缓解率 80%(无死亡,2 例 SD,3 例 PR,5 例 CR),6 个月总体生存率 90%,有效缓解率 80%(1 例死亡,1 例 PD,3 例 PR,5 例病 CR);12 个月总体生存率 80%,有效缓解率 60%(2 例死亡,2 例 PD,3 例 PR,3 例 CR);36 个月总体生存率 50%,有效缓解率 30%(5 例死亡,2 例 PD,3 例 CR)。结论 异体 NK 细胞治疗肝恶性肿瘤临床安全性良好,可提高患者短期生活质量,改善临床症状,在肝恶性肿瘤的治疗中具有一定的临床应用价值。

**【关键词】** NK 细胞;细胞治疗;肝恶性肿瘤

**A clinical study on the efficacy of natural killer cell therapy on patients with malignant liver tumors** *LI Li<sup>1,2</sup>, ZHOU Feng<sup>1</sup>, WANG Xiao-jin<sup>1</sup>, XU Yi-bing<sup>3</sup>, SHI Li-qin<sup>1</sup>, LI Zhen-yu<sup>1</sup>, ZHOU Heng<sup>1</sup>, FU Qing-chun<sup>1,2</sup>, CHEN Cheng-wei<sup>1</sup>.* 1. 905 Hospital, Liver Disease Center; 2. Shanghai Clinical Center of Public Health, Center of Liver Disease; 3. Shanghai Yuyan Biotechnology Co., LTD

Corresponding author: FU Qing-chun, Email qcfu85@163.com; CHEN Cheng-wei, Email ccw2@163.com

**【Abstract】** **Objective** To observe the safety and efficacy of natural killer (NK) cell transfusion in the treatment of malignant liver tumors. **Methods** Ten patients with malignant liver tumors that had been treated by operation, transcatheter arterial chemoembolization (TACE) or microwave ablation were enrolled in this study. They received transfusion therapy with NK cells derived from their immediate family. The safety and short-term efficacy of this treatment was evaluated by observing the patients' response to transfused allogeneic NK cells, and the changes of life quality (KPS score), liver and kidney function, blood routine, circulating tumor cells (CTC), overall remission rate, overall survival rate and other indicators before and after the treatment. **Results** (1) After allogeneic NK cell transfusion, one patient developed chills with chest tightness at half an hour post cell infusion and received symptomatic treatment. After 15 minutes, the symptoms were relieved and the temperature rose to the highest of 39.9℃, accompanied by nausea and vomiting. After being treated with Metoclopramide and Tylenol, the symptoms gradually disappeared and there was mild muscle soreness at the next day. One case had insomnia. The mental, appetite and physical strength of 5 patients improved significantly; (2) The number of CTC measured at 24 hours after infusion in 10 patients was lower than that before transfusion and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant change in liver and renal function; (3) Patients were followed up for 3 ~ 36 months. According to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (mRECIST; complete response = CR, partial response = PR, stable disease = SD; progressive disease = PD), the 3-month overall survival rate was

基金项目:长宁区卫生健康委员会科研项目(20154Y017)

作者单位:上海市公共卫生临床中心肝病中心(李莉,傅青春);中国人民解放军海军第九〇五医院肝病中心(李莉,周丰,王晓今,施莉琴,李震宇,周桁,陈成伟);上海宇研生物技术有限公司(徐以兵)

通信作者:傅青春,Email: qcfu85@163.com;陈成伟,Email: ccw2@163.com

100%, effective response rate was 80% (no death, 2SD, 3PR, 5CR); the 6-month overall survival rate was 90%, effective Response rate was 80% (1 death, 1PD, 3PR, 5CR); overall survival rate at 12 months was 80%, effective response rate was 60% (2deaths, 2PD, 3PR, 3CR); overall survival rate at 36 months was 50%, and effective response rate was 30% (5 deaths, 2PD, 3CR). **Conclusion** NK cells transfusion in the treatment of malignant liver tumors has good clinical safety. The treatment may improve the short-term quality of patients' life, improve clinical symptoms and thus has certain clinical value in the treatment of malignant liver tumors.

**【Key words】** Natural killer cell; Cell therapy; Liver malignant tumors

肝恶性肿瘤是常见的恶性肿瘤之一,由于其早期发现率较低,多数患者就诊时已达中晚期,失去手术或放、化疗的最佳时机,生物免疫治疗是近几年备受青睐的肿瘤治疗新技术。NK 细胞治疗是其中的一种, NK 细胞是具有直接杀伤功能的天然免疫效应细胞,在清除肿瘤细胞中起关键作用。有研究表明, NK 细胞治疗联合传统肿瘤治疗手段能够有效提高肿瘤治疗效果<sup>[1]</sup>。谢云波等<sup>[2]</sup>指出,同种异体 NK 细胞治疗原发性肝细胞癌有很好的安全性和有效性。本研究采用异体 NK 细胞治疗肝恶性肿瘤患者 10 例,观察其安全性和有效性。

## 资料与方法

### 一、研究对象

10 例患者为 2016 年 1 月至 2017 年 5 月在 905 医院肝病中心接受 NK 细胞治疗且定期随访者,其中男性 7 例,女性 3 例;中位年龄为 61.5 岁。原发性肝癌 6 例,转移性肝癌 4 例。既往治疗:手术切除联合介入治疗 5 例,介入联合射频消融治疗 3 例,化疗联合介入治疗 2 例。本研究方案由 905 医院伦理委员会批准(总后批件号:卫医疗[2014]67 号)及指导。

### 二、纳入标准

①本人或其法定代理人签署《知情同意书》;②年龄 18~70 岁;③经影像学或病理学确诊为肝脏恶性肿瘤,符合下列任一条:a. 肿瘤直径 $\geq 5$  cm 或 2 个以上肿瘤且至少有一个直径 $\geq 3$  cm,行手术完全切除,1 个月后常规 TACE 治疗,无复发且无远处转移;b. 未行手术切除或手术切除后复发,单个肿瘤直径 $\geq 3$  cm 或多个肿瘤, TACE/消融后 1 个月,影像学检查显示病灶无活动,无远处转移;c. 转移性肝癌符合条件 a 或 b 但原发灶无活动性且无其他处转移;④Child 评分为 A 级或 B 级者;⑤外周血白细胞数 $> 3 \times 10^9/L$ ;⑥患者一般状况可,生存预期在 3 个月以上。

### 三、排除标准

①高度过敏体质或有严重过敏史,尤其对 IL-2 过

敏者;②休克,全身衰竭,生命体征不正常,以及不能配合检查者;③有精神或心理疾病不能配合治疗及疗效评估者;④T 淋巴细胞癌/瘤;⑤全身感染或局部严重感染需抗感染治疗患者;⑥合并心、肺、脑、肾、肝等重要脏器的功能障碍;⑦凝血功能障碍性疾病(如血友病);⑧传染性疾病(如 HIV、RPR、活动性结核等);⑨妊娠期或哺乳期妇女,或半年内有妊娠计划的妇女;⑩正在使用免疫抑制药物或器官移植后长期服用抗排异药的患者;B11 严重自身免疫性疾病患者。

### 四、NK 细胞培养

采集供者(患者直系亲属年龄为 18~50 岁)外周血 100 mL,予上海宇研生物技术有限公司进行 NK 细胞培养及质控检查。

### 五、NK 细胞治疗方案

细胞培养 2 周后,开始进行 NK 细胞回输治疗,每天 1 次,每次 NK 细胞数量均为  $1 \times 10^9$  个/100 mL,连续 2 次为 1 个疗程,共 3 个疗程,每个疗程间隔 1 个月。受试者分别在第一疗程首次细胞输注后的 3 个月、6 个月、9 个月、1 年进行有效性的访视观察,整个临床研究观察持续 3 年。

### 六、疗效评价

#### 1. 安全性评价

(1)不良反应观察:静脉回输过程中及回输后 24 h 内密切观察患者是否出现发热、皮疹、乏力、肌肉酸痛、呕吐等不良反应。

(2)生活质量评估:用 KPS 评分及睡眠、食欲等的改变来评估生活质量的改善。

(3)临床相关指标的检测:治疗前后常规检查患者血常规(白细胞、中性粒细胞、单核细胞、血小板),血生化(GLU/ALT/AST/A/TBil/DBil/Cr/BUN/)。

2. 细胞治疗前后循环肿瘤细胞(CTC)计数的变化:输注后 24 h CTC 计数变化。

3. 疗效评价方法:患者治疗前和治疗后每 3 个月对病灶进行 CT 或 MRI 扫描,评估病情。临床疗效根据实体瘤疗效评价标准:分为完全缓解(CR)、部分缓

解(PR)、病情稳定(SD)和疾病进展(PD)。以 CR + PR(%)计算有效缓解率(ERR)。

### 七、统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析,正态分布的计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、安全性评价

1. 不良反应观察:1 例患者细胞输注后半小时出现畏寒、寒战、胸闷,给予对症处理,15 min 后症状缓解体温升高,最高至 39.9℃,伴恶心、呕吐,予以胃复安及泰诺处理后,症状逐渐消失,次日有轻度肌肉酸痛;1 例出现失眠;其余患者耐受性较好,均无其他严重不良反应。

2. 生活质量评价:治疗前 KPS 评分为  $81.0 \pm 13.7$ ,治疗后 KPS 评分为  $87.0 \pm 11.9$ ,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。其中 5 例患者疲倦、乏力及精神、食欲不振等临床症状有明显改善。

3. 肝肾功能相关指标:治疗前后患者血常规(白细胞、中性粒细胞、单核细胞、血小板),及肝肾功能(GLU/ALT/AST/A/TBil/DBil/Cr/BUN/)检测均无明显改变。

### 二、治疗前后 CTC 计数的变化

10 例患者输注后 24 h 测 CTC 数减少,回输前为 3~5 个/mL,回输后为 1~3 个/mL,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 三、疗效评价

10 例均接受异体 NK 细胞治疗,所有患者经治疗后随访 3~36 个月,经 CT 及 MRI 检查,临床疗效为:3 个月总体生存率 100%,有效缓解率 80%(无死亡,2 例 SD,3 例 PR,5 例 CR),6 个月总体生存率 90%,有效缓解率 80%(1 例死亡,1 例 PD,3 例 PR,5 例 CR);12 个月总体生存率 80%,有效缓解率 60%(2 例死亡,2 例 PD,3 例 PR,3 例 CR);36 个月总体生存率 50%,有效缓解率 30%(5 例死亡,2 例 PD,3 例 CR)。

## 讨 论

据统计 2015 年我国肝癌新发病例和死亡病例分别占恶性肿瘤的第四位和第二位<sup>[3]</sup>。肝癌早期诊断困难,病情进展迅速,尽管目前肝癌的诊断治疗不断取得进展,但进一步提高疗效,特别是改善中晚期患者的预后仍面临很多挑战<sup>[4]</sup>。NK 细胞占肝脏淋巴细

胞总数的 25%~50%,在肝脏免疫中发挥重要作用,NK 细胞的衰竭和细胞因子的产生受损可能是肝癌发生的预测因子,肝癌患者外周血中的 NK 细胞数量与患者存活率和预后密切相关<sup>[5]</sup>。研究表明,肝癌患者的 NK 细胞活性显著降低,提高 NK 细胞活性有助于预测肝癌患者肝切除术后的复发和预后<sup>[6]</sup>。目前增加 NK 细胞数量、提高 NK 细胞活力成为靶向 NK 细胞免疫治疗的主要策略,如通过 NK 细胞过继转输、免疫抑制剂、基因修饰 NK 细胞及使用双特异性或三特异性抗体等增加 NK 细胞数量、增强 NK 细胞靶向性及 NK 细胞活性。NK 细胞不仅能直接杀伤恶性病变细胞,还能参与调节免疫细胞应答,在多种肿瘤免疫治疗策略中发挥了作用。研究表明,NK 细胞治疗对不同肿瘤的疗效存在差异,在血液肿瘤的治疗中发现,NK 细胞联合干细胞治疗使患者 2 年的生存率达到 36%,较单独使用干细胞治疗 2 年生存率(约 15%)明显提高,可使白血病患者无病生存期延长平均 1.5 年,对于复发难治型白血病可获得高达 40%的完全缓解率<sup>[7-9]</sup>。单独使用 NK 细胞治疗实体瘤效果欠佳,在有关直肠癌、食管癌、肾癌、胃癌等临床试验中,NK 细胞过继治疗临床应答不佳<sup>[10]</sup>。实体瘤治疗效率低的主要原因考虑与肿瘤微环境的免疫抑制作用有关<sup>[11]</sup>。因此,推测 NK 细胞联合疗法可能会增强疗效。而传统肿瘤治疗手段包括手术、放化疗,可以在一定程度上降低肿瘤负荷,也可以提高肿瘤细胞免疫治疗疗效。

本研究对 10 例肝恶性肿瘤在常规治疗的基础上进行异体 NK 细胞治疗,有 1 例患者在输注 1 h 内出现畏寒、寒战、发热、恶心、呕吐等症状,对症处理后症状缓解,绝大多数无其他严重不良反应,有较好的耐受性;多数患者乏力、食欲不振及精神状态差等临床症状有明显改善,患者短期内一般情况得到改善;此外,NK 细胞回输 24 h 后,患者外周血中的 CTC 减少,由输注前 3~5 个/mL 下降至 1~3 个/mL。Zhou 等<sup>[12]</sup>的研究发现,手术前 CTC 及调节性 T 细胞计数较高的肝癌患者发生术后复发的风险高于低计数水平患者,且 EpCAM + CTC  $\geq 2.22$ /mL 是患者术后 1 年内复发的独立危险因素。Hao 等<sup>[13]</sup>的研究结果则显示,EpCAM + CTC  $\geq 3.5$  个/mL 的肝细胞癌患者手术切除后的复发率高于  $< 3.5$  个/mL 的患者。也有研究显示,肝癌细胞在疾病早期即可从实体瘤中脱离并进入外周循环而成为 CTC,即使在未发生远处转

(下转第 1061 页)