

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.08.010

· 临床研究 ·

脐血单个核细胞诱导分化的免疫细胞对小细胞肺癌患者免疫功能的影响

赵瑞东, 邱英[△], 云霏雨, 周二霞, 韩霞, 刘秉春, 云升(内蒙古医科大学附属医院 干细胞研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘要] **目的:** 评价脐带血来源单个核细胞(umbilical cord blood mononuclear cell, UCMC)诱导分化的免疫细胞对小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)患者免疫功能的影响。**方法:** 选取2012年1月至2015年12月就诊于内蒙古医科大学附属医院的90例SCLC患者, 采用分层随机方法分为对照组(45例, EP方案)和研究组(45例, EP方案+UCMC诱导分化的免疫细胞), 研究组患者在化疗结束后3~5 d进行一个疗程的UCMC诱导分化的免疫细胞治疗[(1~3)×10¹⁰个细胞/疗程], 每30 d为一个周期。治疗前及治疗结束后12周, 采用流式细胞术检测患者外周血中T细胞亚群的变化及相关因子IFN- γ 、IL-2、IL-10、TGF- β 1的变化, 评价患者生活质量和不良反应等。**结果:** 研究组获得CR 15例、PR 25例、SD 5例, 研究组T细胞亚群含量较对照组有明显增加($P<0.01$)、并且恢复正常范围的时间明显短于对照组($P<0.05$); 80.9%的患者炎性细胞因子IFN- γ 在血清中升至或高于正常范围, IL-10、TGF- β 1较治疗前降低($P<0.05$); 患者生活质量较对照组有显著提高。**结论:** UCMC诱导分化的免疫细胞可以促进SCLC患者化疗后免疫功能的恢复。

[关键词] 脐血; 诱导分化; 免疫细胞; 小细胞肺癌

[中图分类号] R730.5; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)08-0810-07

Effect of immune cells induced and differentiated by umbilical cord blood mononuclear cells on immune function of patients with small cell lung cancer

ZHAO Ruidong, QIU Ying[△], YUN Feiyu, ZHOU Erxia, HAN Xia, LIU Bingchun, YUN Sheng (Stem Cell Research Center, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of immune cells induced and differentiated by umbilical cord blood mononuclear cells (UCMCs) on the immune function of patients with small cell lung cancer (SCLC). **Methods:** Ninety patients with SCLC, who were admitted to the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University from January 2012 to December 2015, were randomly divided into control group (45 patients, EP regimen), study group (45 patients, EP regimen+UCMC-induced and differentiated immune cells). The study group of patients received immune cell treatment 3-5 d after chemotherapy [(1-3)×10¹⁰cells/treatment], 30 d for a cycle. The changes in T cell subsets, IFN- γ , IL-2, IL-10 and TGF- β 1 in peripheral blood of patients were observed by flow cytometry at pre-treatment and 12 weeks post-treatment. Life quality and adverse events of patients were evaluated. **Results:** The study group, 15 cases achieved CR, 25 cases of PR and 5 cases of SD. The percent of T cell subsets in the study group was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$), and the time of return to normal level was obviously shorter ($P<0.05$). The serum level of inflammatory cytokine IFN- γ increased or exceeded the normal range in 80.9% patients, and IL-10 and TGF- β 1 levels were significantly decreased as compared with pretreatment ($P<0.05$). The quality of life was obviously better than that of the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Immune cells induced and differentiated by UCMCs can promote the recovery of immune function of patients with SCLC.

[Key words] umbilical cord blood; induced and differentiated; immune cells; small cell lung cancer

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(8): 810-816. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.010]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81360354); 内蒙古自治区科技计划资助项目(No. 20130401)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81360354), and the Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No.20130401)

[作者简介] 赵瑞东(1981-), 男, 工程师, 主要从事干细胞及肿瘤免疫治疗研究, E-mail: nmgzrd@163.com; 邱英(1961-), 女, 主任医师, 主要从事干细胞及肿瘤免疫治疗研究, E-mail: yingqium@hotmail.com。△为共同第一作者

[通信作者] 云升(YUN Sheng, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: yunsheng_1962@163.com

肺癌是中国乃至全世界最常见的恶性肿瘤以及首位的癌症死亡原因。吸烟是肺癌的主要危险因素。根据对1970至1999年世界范围内吸烟与肺癌的汇总分析,肺癌,尤其是小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)的发病与吸烟强度(吸烟量)和持续时间呈正相关。根据世界癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)的统计数据,2012年,全球肺癌新发病例约182.5万例,死亡病例约159.0万例;据中国肿瘤登记中心统计,中国2016年肺癌新发病例约70.5万例,死亡病例约50余万例,是危害居民生命健康的最主要的恶性肿瘤。随着工业化、城市化进程的进一步加速所导致的空气污染以及吸烟率的居高不下,肺癌的发病率与病死率呈现双率第一的状态。SCLC的发病率约占肺癌的15%左右^[1-2],与非小细胞肺癌相比,是一类分化程度低、生长迅速、侵袭性强、转移早而广泛、预后较差的恶性肿瘤,因此当患者发现病症时,病情已处于晚期^[3]。近年SCLC治疗并无明显进展,免疫治疗已成为继手术、放化疗后的又一重要手段。虽然免疫治疗的具体治疗方式存在差异,但总体是通过最大限度地激发机体免疫力对抗肿瘤细胞从而达到治疗目的,如增强或恢复患者机体免疫机制,改变肿瘤生长环境,抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭、浸润作用,增强抗肿瘤免疫效应,激发协同治疗效应^[4-5]。脐血来源的免疫细胞是一群由脐带血单个核细胞(umbilical cord blood mononuclear cell, UCMC)经多种细胞因子联合诱导的免疫细胞,其表面表达T细胞表面标志CD3,同时也表达NK细胞表面标志物CD16和CD56。本研究回顾性分析内蒙古医科大学附属医院化疗+细胞免疫治疗模式治疗SCLC,旨在探究其治疗对患者免疫系统功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人肺癌NCIH-446细胞购自北京协和细胞库。无血清培养基购自Corning公司,细胞因子购自ACRO Biosystems公司,淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,IFN- γ ELISPOT检测试剂盒购自达科为生物技术集团,淋巴亚群分析试剂盒购自美国BD公司。FACS Calibur型流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 研究对象

病例纳入标准:(1)经组织病理学确诊的SCLC患者;(2)KPS(Karnofsky performance score)评分>60分以上;(3)预计生存期至少4个月,并未接受其他抗肿瘤方案的治疗。病例排除标准:(1)器官功能衰竭者(肝功能Child Pugh分级C级以上、心功能四级、或严重呼吸衰竭者);(2)同时接受其他抗肿瘤方法治疗者;(3)生物制剂过敏的患者;(4)严重凝血功能异常;(5)有器官移植史;(6)有明确感染或者不明原因的发热患者;(7)妊娠及哺乳期女性;(8)艾滋病阳性,吸毒成瘾者;(9)T淋巴瘤患者、自身免疫性疾病或其他恶性肿瘤患者。本研究经由内蒙古附属医院医科大学伦理委员会审查批准,研究时间为2012年1月至2015年12月,全部患者均签署知情同意书。

90例病理学确诊的小细胞肺癌患者被纳入临床研究(表1),包括44例女性和46例男性,年龄47~75岁(中位年龄63岁)。采用分层随机划分组的方法,分为对照组45例(EP方案),研究组45例(EP方案+UCMC诱导分化的免疫细胞)。

表1 两组SCLC患者的临床资料比较(n)

Tab. 1 Comparison of the clinical data between the groups of patients with SCLC (n)

Characteristic	Study group	Control group	P
Number of patients	45	45	
Age(t/a)	56.2(35-70)	57.3(32-75)	>0.05
Gender			
Female	21	22	
Male	24	23	
Diseases type			>0.05
Right lung adenocarcinoma	7	9	
Left lung adenocarcinoma	13	12	
Right lung squamous cell carcinoma	10	13	
Left lung small cell lung carcinoma	15	11	
History of previous treatment			>0.05
Chemotherapy	8	12	
Radiotherapy	6	7	
Radio+chemotherapy	31	26	

1.3 治疗方案

两组患者均采用EP方案化疗,依托泊甙100 mg/m²、顺铂25 mg/m²静滴d1-d3,3周为一周期。化疗后每周复查血常规、肝肾功能,若出现白细胞、中性粒细胞、血小板Ⅱ度以上减少,采用重组G-CSF提升白细胞、重组人IL-11(巨和粒)提升血小板相对应处理,待血象恢复后可继续化疗。化疗持续至患者出现病情进展或不可耐受的毒性反应,如病情未出现进展或不可耐受的毒性,则可应用4~6个周期。研究组患者治疗方案:患者在化疗结束后3~5 d进行1个疗程的UCMC诱导分化的免疫细胞治疗,每疗程免疫细胞回输分为4次[总细胞数>(1~3)×10¹⁰/疗程],每30 d为1个治疗周期,直至病情进展或放弃治疗,至少完成4个周期治疗。

1.4 UCMC诱导的免疫细胞制备及细胞表型检测

脐带血取自内蒙古医科大学附属医院产科健康、正常足月剖宫产妇,均已征得产妇及家属授权同意并签署知情同意书,且方案经医院伦理委员会审查批准。经淋巴分离液分离获取的UCMC以1×10⁷个/ml的密度接种于无血清培养基中,使用多种细胞因子刺激培养,包括IFN-γ(500 U/ml);CD-3单克隆抗体(OKT3 monoclonal antibody; 30 ng/ml),IL-2(500 U/ml)等细胞因子,每2 d使用新鲜的完全培养基换液扩增细胞,直到第12天。

培养至12 d,通过流式细胞术进行免疫细胞的表型测定。取细胞悬液1 ml(细胞数≥5×10⁶个),300×g离心5 min,弃上清,用3 ml PBS悬浮细胞,取3支流式管,编为1、2、3号,分别加入1 ml细胞悬液。第1管中加入20 μl鼠抗人IgG1-FITC同型对照抗体,第2支加入鼠抗人CD3-FITC、CD8-PE、CD4-APC、CD45-PerCP抗体各10 μl,第3管加入CD3-FITC、CD19-APC和CD16/56-PE抗体各10 μl,避光孵育15 min后,300×g离心5 min,弃上清,分别用1 ml PBS洗涤细胞一次,然后分别加入500 μl PBS悬浮细胞,在FACS Calibur型流式细胞仪上检测细胞表型,并使用BD CELLQUEST软件进行分析。

1.5 MTT法检测免疫细胞的细胞毒性

UCMC诱导获得的免疫细胞作为效应细胞,肺癌NCIH-446细胞作为靶细胞。将靶细胞(1×10⁴个/100 μl)与效应细胞(1×10⁵个/100 μl)加入到96孔板中,单独的效应细胞作为阴性对照。细胞在37℃、75%湿度、5% CO₂环境中孵育24 h,酶标仪测定570 nm光密度(D)值。细胞杀伤率(%)=[1-(D(效应细胞+靶细胞)-D(单独效应细胞))/D(单独靶细胞)]×100%。实验重复3次。

1.6 免疫细胞临床治疗方案

UCMC诱导、扩增的免疫细胞分为4份,连续回输4 d,被定义为1个疗程,每个月1个疗程,共4个疗程。每疗程细胞回输量为(1~3)×10¹⁰个,最初2 d剂量约为2×10⁹/d,后2 d增加到(3~4)×10⁹/d。回输细胞前取培养液进行细菌、真菌、支原体、内毒素检测,结果均应为阴性。

1.7 疗效及不良反应的观察和评价

所有患者均接受2个周期以上治疗后评价疗效,通过CT来监测肿瘤大小。检测患者治疗后3个月肿瘤标志物的变化,包括免疫治疗后每月监测乳酸脱氢酶(LDH)和β2-微球蛋白。采用RECIST疗效评价标准(RECIST1.1)判断疗效,分为完全缓解(complete response, CR):所有靶病灶全部消失;部分缓解(partial response, PR):靶病灶最长径之和与基线状态比较,至少减少30%;疾病进展(progressive disease, PD):靶病灶最长径之和与治疗开始之后所记录到的最小的靶病灶最长径之和比较,增加20%,或者出现一个或多个新病灶;疾病稳定(stable disease, SD):介于PR和PD之间;临床有效率(response rate, RR):(CR+PR)/总例数×100%,疾病控制率(disease control rate, DCR):(CR+PR+SD)/总例数×100%。无进展生存期(progression-free survival, PFS):从化疗开始至影像学检查发现肿瘤进展的时间。

不良反应按照美国国家癌症研究所3.0毒性评价标准对毒副反应进行分级,患者接受1个周期治疗后即开始评价其毒性,毒性分为0~IV级。监测患者即时和延迟的毒性反应(如过敏、皮肤反应、发烧、头痛、肌痛、骨关节炎、高血压、低血压、咳嗽、心、肝或肾功能和自身免疫性疾病)。

1.8 流式细胞术检测淋巴细胞亚群

完成化疗和免疫细胞治疗后,第3个月收集患者外周血样品。使用EDTA-K2抗凝真空采血管,抽取2 ml静脉血。取两只流式专用管A1、A2,A1管加入CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-PreCP/CD19-APC共20 μl;A2管加入CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PreCP/CD4-APC共20 μl,两管中分别再加入全血100 μl,混匀,室温避光孵育15 min,300×g离心5 min,弃上清液,PBS洗涤细胞两次,300×g离心5 min,弃上清液,加入1%多聚甲醛0.5 ml,流式细胞术检测患者淋巴细胞亚群水平,并使用BD MultiEST软件进行分析。

1.9 ELISPOT和ELISA法检测免疫细胞治疗对患者PBMC中相关免疫因子水平的影响

ELISPOT法测定在患者治疗前和12周后测量PBMC的IFN-γ分泌。按照制造商的说明书,将96孔分析板(Dakewe)用抗IFN-γ抗体在4℃下预包被过夜。将患者淋巴细胞裂解物(相当于10⁵个细胞)刺激

的PBMC以 $5 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ 的密度接种在含有10%人AB血清的RPMI-1640培养基中,一式3孔。未刺激的PBMC用作对照。使用Bioreader 4000-PRO-X (Bio-Sys GmbH)计数深蓝色斑点。阳性斑点的临界值:高于平均光斑直径标准偏差的3倍的值。阳性点以斑点形成细胞 (spot-forming cells, SFC) 数计算。

应用ELISA法检测治疗前后IFN- γ 、IL-2、LDH、 β 2微球蛋白(β 2-microglobulin)、TGF- β 1、IL-10的变化。根据ELISA试剂盒说明书对标准品进行稀释,将样品加于酶标板孔底部轻轻晃动混匀,用封板膜封板后置 37°C 温育30 min,洗涤5次,加入酶标试剂 $50 \mu\text{l}$,空白孔除外,板膜封板后置 37°C 温育30 min,洗涤5次,每孔先加入显色剂A $50 \mu\text{l}$,再加入显色剂B $50 \mu\text{l}$,轻轻震荡混匀, 37°C 避光显色15 min,每孔加终止液 $50 \mu\text{l}$,终止反应(此时蓝色立转黄色),以空白空调零,15 min内依序测量450 nm波长处各孔的D值。

1.10 统计学处理

应用SPSS统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 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 成功制备UCMC诱导分化的免疫细胞

UCMC诱导分化的免疫细胞组成成分要求:CD3⁺细胞 $\geq 90\%$;CD3⁺CD4⁺细胞 $\geq 20\%$;CD3⁺CD8⁺细胞 $\geq 50\%$;CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞 $\geq 60\%$;CD3⁺CD45⁺细胞 $\geq 80\%$ 。细胞流式检测鉴定UCMC诱导的免疫细胞的主要表型(图1)为CD3⁺(92.4 \pm 5.3)%、CD3⁺CD4⁺(26.5 \pm 6.1)%、CD3⁺CD16⁺CD56⁺(64.4 \pm 5.2)%、CD3⁺CD8⁺(61.3 \pm 5.1)%、CD3⁺CD45⁺(93.2 \pm 5.3)% T细胞,结果说明,制备的免疫细胞完全符合要求。

2.2 免疫细胞对NCIH-446细胞有较强的杀伤力

MTT法测定UCMC诱导的免疫细胞对肺癌细胞NCIH-446的杀伤率为(48.39 \pm 5.01)%,说明制备的免疫细胞对SCLC细胞有较强的杀伤力。

2.3 免疫细胞有较好的辅助治疗疗效

总共90例患者被安排在临床研究中,其中研究组、对照组各45例,总随访时间60个月,部分患者在随访期间未完成所有必要的免疫测定或接受新疗程的化疗和/或放射治疗(研究组中共有4人失访,对照组中共有6人失访,分别占比8.9%和13.3%)。为了调查UCMC诱导的免疫细胞对疾病状况的影响,每12周通过PET-CT评估一次患者的病情,19例患者

CR,39例PR,14例SD,16例PD(表2)。统计学分析显示,研究组的RR和DCR分别为75.6%和95.6%,明显高于对照组的53.3%和64.4%。说明免疫细胞治疗对CR,PD和病死率有着显著影响($P < 0.01$),有效改善PR($P < 0.05$)。KPS的生活质量调查显示,研究组45例患者中有34例显著改善。

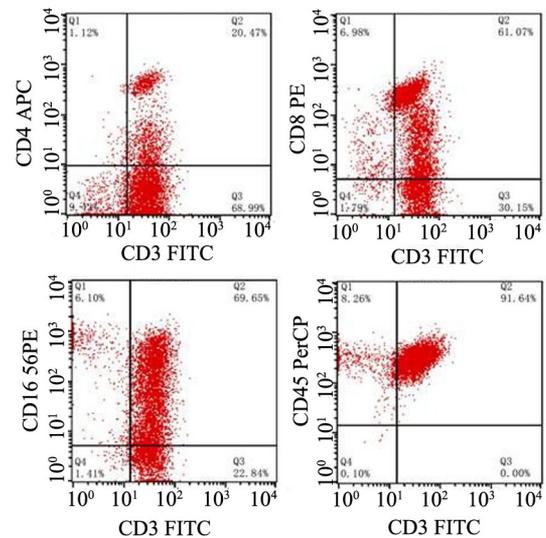


图1 流式术检测UCMC诱导分化的免疫细胞表型
Fig. 1 Phenotypes of UCMCs-derived immune cells detected by flow cytometry

表2 SCLC患者治疗疗效评价[n(%)]
Tab. 2 Evaluation of treatment efficacy in patients with SCLC[n (%)]

Curative effect	Study group	Control group
CR	28.9(13/45)**	13.3(6/45)
PR	46.7(21/45)*	40.0(18/45)
SD	20.0(9/45)	11.1(5/45)
PD	4.4(2/45)**	31.1(14/45)
Died	0**	4.5(2/45)

CR: Complete response; PR: Partial response; SD: Stable disease; PD: Progressive disease. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group

2.4 免疫细胞治疗有良好安全性

UCMC诱导分化的免疫细胞回输后观察患者的不良反应发现,其中28例患者发烧($37.5 \sim 38.0^\circ\text{C}$)不足12 h,采用物理降温法降温;9例轻度皮疹、1例中度皮疹,肌注25 mg/d非那根至皮疹消失。5例患者治疗过程中伴随有短暂性低血压。没有观察到III或IV级不良反应或其他严重副作用,常规实验室检查也没有实质变化,包括心、肝肾功能,抗双链DNA(ds-DNA)、抗核抗原(ANA)或不可提取的核抗原(Sm、SS-A/Ro、SS-B/La和RNP)抗体。

2.5 治疗前后外周淋巴细胞亚群的变化

为了评估脐带血来源免疫细胞回输对特异性淋巴细胞亚群恢复的影响,在免疫细胞治疗前以及治疗3个月后检测患者外周血淋巴细胞亚群(表3)。在进行治疗前,两组患者的淋巴细胞亚群间没有显著

差异($P>0.05$)。进行治疗3个月后,研究组CD3⁺、CD3⁺/CD4⁺、CD3⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺/CD56⁺细胞比例均显著高于对照组,Treg较对照组显著减少(均 $P<0.01$);CD4/CD8比值恢复正常,而对照组在治疗7个月后仍未回复正常。

表3 SCLC患者治疗前后外周血淋巴亚群变化(%)

Tab. 3 Alteration of lymphoid subsets in peripheral blood lymphocyte subgroup of patients with SCLC before and after immunotherapy (%)

Lymphocyte subset	Study group		Control group	
	Pre	Post	Pre	Post
CD3 ⁺	63.21±9.81	78.01±8.14**	61.52±10.36	52.37±11.14
CD3 ⁺ CD4 ⁺	26.73±6.35	40.62±4.59**	27.42±5.24	20.59±6.41
CD3 ⁺ CD8 ⁺	31.29±3.49	42.51±5.41**	33.74±4.27	27.81±3.94
CD16 ⁺ CD56 ⁺	14.53±4.61	25.16±4.58**	15.17±3.62	13.85±4.25
CD19 ⁺	5.67±1.69	8.09±1.71**	5.49±1.17	4.68±1.42
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.57±0.14	1.08±0.13**	0.61±0.11	0.52±0.12
Treg	6.57±0.74	4.59±0.67**	6.79±0.46	6.27±0.58

** $P<0.01$ vs Control group

2.6 免疫细胞治疗后SCLC患者外周血中相关因子的变化

治疗前两组患者IFN- γ 、IL-2、LDH、 β 2微球蛋白、TGF- β 1、IL-10水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗结束后12周时,研究组肿瘤标志物

LDH、 β 2微球蛋白、TGF- β 1、IL-10水平较治疗前下降,且低于对照组治疗后水平,而IFN- γ 、IL-2水平较治疗前升高(均 $P<0.05$);对照组治疗前后各种因子无明显变化(表4)。

表4 免疫细胞治疗3个月后SCLC患者外周血中细胞因子水平

Tab. 4 Serum level of cytokines in patients with SCLC after 3 months of immunotherapy

Group	Study		Control	
	Pre	Post	Pre	Post
IFN- γ (SFC)	3.13±2.52	13.74±1.96*	3.34±2.16	2.76±1.67
IL-2 [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	12.19±2.52	14.26±2.35*	13.46±1.93	9.57±1.83
LDH [$Z_B/(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$]	365.87±76.32	218.76±54.31*	352.86±91.53	337.28±62.72
β 2-microglobulin [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	2635.58±584.42	979.89±313.76*	1358.92±483.64	2185.71±633.96
TGF- β 1 [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	119.49±16.91	87.55±19.43*	88.45±13.78	113.17±21.62
IL-10 [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	108.94±12.71	75.79±11.22*	76.45±10.32	99.58±15.79

* $P<0.05$ vs Control group

3 讨论

免疫系统在身体对抗癌细胞的攻击中至关重要。SCLC导致患者的免疫功能受损,而化疗又会引起严重的造血功能抑制和免疫功能抑制。SCLC无法根治的原因之一是由于肺癌患者的免疫功能低下,无法实现有效的免疫应答^[6-7]。由于化疗能够杀死CD3⁺细胞,使免疫抑制加重,所以SCLC患者在长期免疫受损的状况下,增加了SCLC的复发和转移的可能^[8]。临床尝试了许多技术手段和药物来增强

SCLC患者的免疫力^[9-10],但并没有哪一项被证实是切实有效的。

人体抗肿瘤免疫的主要过程为T淋巴细胞介导的细胞免疫,而T细胞亚群之间的平衡对于维持该免疫过程稳定进行至关重要。从本研究结果来看,UC-MC诱导的免疫细胞是多种细胞的混合细胞群,以CD3⁺CD45⁺、CD3⁺CD16⁺CD56⁺和CD3⁺CD8⁺细胞为主要组成细胞。整个免疫细胞群体CD3⁺CD45⁺细胞群体占比90%以上,该类细胞中含有的记忆T细胞,其表面黏附分子丰度高,能直接向抗原部位移行,当再

次受到抗原刺激时即可发生强烈的免疫反应。相关研究^[11]表明,记忆T细胞与对肿瘤细胞的杀瘤率成正比,这可能是免疫细胞具有高杀瘤活性的一个重要原因。

本项研究中的研究组采用采用EP化疗方案联合脐带血来源免疫细胞免疫治疗,其RR和DCR高于单一EP化疗的对照组,较其他临床研究采用的自体外周血或异体外周血来源的CIK联合EP方案的治疗结果更好。研究^[12]显示,CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞数量的增加显著增加了具有抗肿瘤作用的NK和NKT细胞的数量。脐带血来源的免疫细胞中主要的效应细胞CD3⁺CD16⁺CD56⁺和CD3⁺CD8⁺细胞表型比例达(64.4±5.2)%和(61.3±5.1)%,高于CIK细胞的(35.1±5.2)%和(55.7±18.5)%,CD3⁺CD16⁺CD56⁺NK细胞样淋巴细胞能够产生特异性和非特异性双重抗肿瘤效应,可能通过穿孔素/颗粒酶、IFN- γ 、TNF- α ,以及诱导凋亡等几个途径杀伤肿瘤细胞。

脐带血来源免疫细胞中的CD4⁺T细胞虽不能直接杀死肿瘤细胞,但可通过对依赖抗原提呈细胞的激发,可促进IFN- γ 、IL-2等细胞因子的分泌,通过诱导肿瘤细胞凋亡或诱导激活细胞毒性T细胞达到杀伤肿瘤细胞的目的^[13]。

肿瘤细胞通过增强Treg活性来抑制CD4⁺或CD8⁺T细胞介导的抗肿瘤免疫^[14-16]。在SCLC患者的外周血中发现存在Treg细胞比例增高,而Treg细胞比例越高,患者预后往往越差^[17-18]。本研究中,通过脐带血来源的免疫细胞治疗,研究组SCLC患者Treg细胞比例显著下降,这可能是由于免疫细胞促进T辅助细胞和NK细胞恢复并直接抑制Treg^[19]。

本研究结果显示,在75.5%(34/45)的患者中,化疗和/或放射治疗后,CD19⁺B细胞的绝对数量下降,而在细胞免疫治疗后的7个月内,B淋巴细胞的绝对值和百分比持续上升,相对治疗前,绝对值及百分比增加约50%($P<0.05$)。CD19⁺B细胞恢复较慢,可能是由于体液免疫反应滞后于细胞免疫反应。

肿瘤患者自身免疫力较正常人低,在进行放化疗后免疫力会进一步降低。有研究^[20-23]显示,癌症干细胞(cancer stem cell,CSC)与癌症进展、转移和耐药性的变化有关,CSC也被证明对于免疫细胞介导的毒性非常敏感。本项临床研究证实,脐带血来源免疫细胞释放的炎性因子,如TNF、IFN- γ 、GM-CSF、IL-2等,不仅对肿瘤细胞有杀伤作用,还可以通过重建和提高患者全身的机体免疫功能,降低Treg数量及减少抑制性细胞因子(IL-10、TGF- β 1),恢复T细胞的增殖和活性;患者LDH和 β 2-微球蛋白含量降低,使受免疫抑制的淋巴细胞快速恢复。这都有助于消除

最小残留病变(minimal residual disease,MRD),从而减少癌症复发。

综上所述,脐带血来源免疫细胞治疗,提高了SCLC的临床有效率,促进了SCLC患者免疫功能的恢复,没有增加不良反应的发生,提高患者的生活质量,取得良好的近期临床治疗效果,表明其临床应用是安全的,但还需要更多患者和更长时间的跟踪研究。

[参考文献]

- [1] RUDIN C M, ISMAILA N, HANN C L, et al. Treatment of small-cell lung cancer: american society of clinical oncology endorsement of the american college of chest physicians guideline[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(34):4106-4111. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.7918.
- [2] FRUH M, DE RUYSSCHER D, POPAT S, et al. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(6): 99-105. DOI: 10.1093/annonc/mdt178.
- [3] TRAVIS W D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas[J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(1): 18-30. DOI:10.1038/modpathol.2011.150.
- [4] JOHNSON L A, MORGAN R A, DUDLEY M E, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen[J]. *Blood*, 2009, 114(3): 535-546. DOI: 10.1182/blood-2009-03-211714.
- [5] ROBBINS P F, MORGAN R A, FELDMAN S A, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(7): 917-924. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.2537.
- [6] REINMUTH N, RECK M. Immunotherapy for lung cancer[J]. *Oncol Res Treat*, 2016, 39(6): 360-368. DOI: 10.1159/000446726 2016.
- [7] HORN L, RECK M, SPIGEL D R. the future of immunotherapy in the treatment of small cell lung cancer[J]. *Oncologist*, 2016, 21(8): 910-921. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0523.
- [8] DING X, CAO H, CHEN X, et al. Cellular immunotherapy as maintenance therapy prolongs the survival of the patients with small cell lung cancer[J/OL]. *J Transl Med*, 2015, 13:158[2018-02-28]. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-015-0514-0>. DOI 10.1186/s12967-015-0514-0.
- [9] HURWITZ J L, MCCOY F, SCULLIN P, et al. New advances in the second-line treatment of small cell lung cancer[J]. *Oncologist*, 2009, 14(10): 986-994. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0026.
- [10] SUNDSTROM S, BREMNES R M, KAASA S, et al. Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(24): 4665-4672. DOI:10.1200/JCO.2002.12.111.
- [11] JIA X Y, YANG W Z, SU Y, et al. Distribution of CD45RO⁺T and CD45RA⁺T cells in peripheral blood of patients with peripheral T cell lymphoma[J]. *J Exp Hematol*, 2015, 23(4): 1017-1020. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.

- [12] PAN Y P, WU Y Y, JI J, et al. Effect of cytokine-induced killer cells on immune function in patients with lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2827-2834. DOI:10.3892/ol.2016.4284.
- [13] MITSDOERFFE M, KUCHROO V, KORN T. Immunology of neuromyelitis optica: a T cell-B cell collaboration[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1283: 57-66. DOI: 10.1111/nyas.12118.
- [14] YUAN C H, SUN X M, ZHU C L, et al. Amphiregulin activates regulatory T lymphocytes and suppresses CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor response in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 32138-32153. DOI: 10.18632/oncotarget.5171.
- [15] FISHER S A, ASTON W J, CHEE J, et al. Transient Treg depletion enhances therapeutic anti-cancer vaccination[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2016, 5(1): 16-28. DOI: 10.1002/iid3.136.
- [16] PERE H, TANCHOT C, BEYRY J, et al. Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(3): 326-333. DOI:10.4161/onci.18852.
- [17] KOYAMA K, KAGAMU H, MIURA S, et al. Reciprocal CD4⁺ T-cell balance of effector CD62L^{low} CD4⁺ and CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ regulatory t cells in small cell lung cancer reflects disease stage[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6770-6779. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1156.
- [18] TWYMANSAIN V C, RECH A J, MAITY A, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer[J]. *Nature*, 2015, 520(7547): 373-377. DOI: 10.1038/nature14292.
- [19] LI H, YU J P, CAO S, et al. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients[J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27(3): 317-326. DOI: 10.1007/s10875-007-9076-0.
- [20] GAMMAITTOINI L, GIRAUDO L, LEUCI V, et al. Effective activity of cytokine-induced killer cells against autologous metastatic melanoma including cells with stemness features[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(16): 4347-4358. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0061.
- [21] TALLERICO R, TODARO M, DIFRANCO S, et al. Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2381-2390. DOI: 10.4049/jimmunol.1201542.
- [22] TODARO M, D'ASARO M, CACCAMO N, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2009, 182(11): 7287-7296. DOI: 10.4049/jimmunol.0804288.
- [23] SARVI S, MACKINNON A C, AVLONITIS N, et al. CD133⁺ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1554-1565. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1541.

[收稿日期] 2018-03-18

[修回日期] 2018-06-09

[本文编辑] 黄静怡