

· 论 著 ·

扩增活化的自体淋巴细胞过继性细胞免疫治疗小细胞肺癌

张国庆^a, 孙胜杰^a, 李瑾昱^a, 胡毅^a, 燕翔^a, 王刚^b, 吴亮亮^b, 焦顺昌^{a*}

(中国人民解放军总医院 a. 肿瘤内一科; b. 肿瘤中心实验室, 北京 100853)

【摘要】 目的: 研初步探讨扩增活化的自体淋巴细胞 (expanded activated autologous lymphocytes, EAAL) 过继性细胞免疫治疗在小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 的疗效。**方法:** 在层流实验室体系下, 由 SCLC 患者外周血单个核淋巴细胞体外诱导扩增 EAAL 细胞, 应用流式细胞术检测其细胞表型。然后回顾性分析 2008 年 5 月~2010 年 10 月在本院接受过 EAAL 免疫治疗以及未接受过 EAAL 免疫治疗的各 16 例 SCLC 患者的临床资料, 分析比较 EAAL 治疗组和对照组总生存期 (OS) 的差异。**结果:** 经过体外培养和扩增, EAAL 细胞表型与培养前外周血淋巴细胞相比, CD_3^+ 、 $CD_3^+CD_8^+$ 、 $CD_{45}RO^+$ 、 CD_{25}^+ 、 CD_{29}^+ 以及 $CD_3^+CD_{16}^+/CD_{56}^+$ 细胞的比例明显增加 ($P<0.05$)。EAAL 治疗组和对照组的 OS 分别为 17.4 个月和 10.0 个月, 两者差异无统计学意义 ($P=0.060$, $HR=0.487$, 95% CI 0.228~1.037)。EAAL 治疗组 1~3 年生存率分别为 81.25%、25.0% 和 18.75%, 而对照组 1~3 年生存率则分别为 43.75%、6.25% 和 0%, 两者差异也无统计学意义 ($P>0.05$)。COX 多因素回归分析结果显示 EAAL 细胞免疫治疗是 SCLC 患者总生存时间延长的独立预后风险因素之一。亚组分析结果显示女性及化疗 ≤ 6 周期 SCLC 患者的 OS 经 EAAL 免疫治疗后得到了延长 ($P<0.05$)。**结论:** EAAL 过继性细胞免疫治疗可能能够延长 SCLC 患者的 OS。

【关键词】 过继性免疫治疗; 小细胞肺癌; 扩增活化的自体淋巴细胞; 流式细胞术; 回顾性临床观察

【中图分类号】 R743

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2016)01-0021-07

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2016.01.005

Adoptive immunotherapy of expanded activated autologous lymphocytes (EAAL) for small cell lung cancer: A retrospective clinical observation

ZHANG Guo-qing^a, SUN Sheng-jie^a, LI Jin-yu^a, HU Yi^a, YAN Xiang^a, WANG Gang^b, WU Liang-liang^b, JIAO Shun-chang^{a*}

(a. Department of Clinical Oncology; b. Laboratory of Tumor research center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the efficacy of expanded activated autologous lymphocytes (EAAL) on small cell lung cancer (SCLC). **Methods:** Thirty-two SCLC patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated, induced and amplified in laminar flow cell culture laboratory system. After EAAL was generated, the phenotypes were detected by flow cytometry. Clinical data of 16 SCLC patients with EAAL immunotherapy and another 16 SCLC patients without EAAL immunotherapy admitted to Chinese PLA General Hospital from May 2008 to October 2010 were retrospectively analyzed. **Results:** After induced and amplified in vitro, the percentage of CD_3^+ , $CD_3^+CD_8^+$, $CD_{45}RO^+$, CD_{28}^+ , CD_{29}^+ , $CD_8^+CD_{28}^+$ and $CD_3^+CD_{16}^+/CD_{56}^+$ cells increased significantly ($P<0.05$). The OS of the immunotherapy group was longer than that of the control group, however the difference was of no statistical significance ($P=0.060$, $HR=0.487$, 95% CI 0.228~1.037). 1-3-year survival rates of the immunotherapy group (81.25%, 25.0% and 18.75%, respectively) seemed better than those of the control group (43.75%, 6.25% and 0%, respectively) but the differences were also of no statistical significance ($P>0.05$). Results of COX multivariate regression analysis showed that the number of chemotherapy cycle and application of EAAL immunotherapy were independent prognostic factors for SCLC patients. The OS in subgroups of female and chemotherapy ≤ 6 cycles was prolonged after EAAL immunotherapy ($P<0.05$). **Conclusion:** EAAL adoptive immunotherapy might prolong the OS in SCLC patients.

【Keywords】 adoptive immunotherapy; small cell lung cancer; expanded activated autologous lymphocytes; flow cytometry; retrospective clinical observation

[收稿日期] 2016-01-10

[基金项目] 军队“十二五”课题计划基金 (JZ90356328)

[作者简介] 张国庆, 男, 博士, 主治医师; 研究方向: 肿瘤免疫治疗; E-mail: qlgd1kl@163.com

[通信作者] * 焦顺昌, 男, 博士, 主任医师, 教授; 研究方向: 肿瘤综合治疗及免疫治疗; E-mail: jiaosc@sina.vip.cn

SCLC是一种恶性程度很高、预后很差的肿瘤,大部分患者在被诊断为SCLC时已有转移,中位生存期为8~12个月,5年生存率只有2%左右^[1]。化疗是SCLC的主要治疗手段,其中依托泊苷(VP)-16联合顺铂或卡铂(EP或CE方案)是标准的一线化疗方案。但一线化疗有效维持时间短,多数患者在化疗停止的6个月内疾病发生进展,而二线治疗能给患者带来的生存获益极其有限^[2]。过继性细胞免疫治疗被认为是重要的抗肿瘤方法之一。许多体外培养扩增的效应性免疫细胞,如淋巴因子激活的杀伤细胞(Lymphokine Activated Killer cells, LAK)^[3-4],活化的自然杀伤细胞(Natural Killer cell, NK)^[5-8],树突状细胞(Dendritic cells, DCs)^[9-10],肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs)^[11-12],细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-Induced Killer, CIK)^[13-15]等,都显示出了一定的抗肿瘤活性。EAAL细胞是一种新型的过继性免疫效应细胞。它是由肿瘤患者自体的T淋巴细胞经抗CD₃单克隆抗体等细胞因子刺激诱导扩增而来。EAAL细胞本身并不是表型单一的一种细胞,它是一个由多种细胞构成的一群异质性细胞群,其中包含约30%的CD₄⁺和60%的CD₈⁺细胞^[16]。有研究表明,EAAL过继免疫疗法是一种安全、可行的治疗方法,可以降低肝细胞癌(HCC)患者18%的术后复发率并改善患者的预后^[17]。EAAL在小细胞肺癌治疗中的作用尚无研究报道。因此,本研究拟通过一项小规模的回溯性临床研究初步考察EAAL细胞免疫治疗对SCLC患者总生存时间的影响。

1 材料和方法

1.1 患者及临床研究设计

本回顾性病例对照研究经本院医学伦理委员会批准后开展。首先根据细胞治疗的记录查找出接受过EAAL治疗经病理学确诊的SCLC患者,将ECOG评分>2分、预计生存时间<12周、失访或临床资料不完整的患者剔除后入组16例为EAAL治疗组研究对象。通过查阅病历及随访,详细记录EAAL治疗组患者的性别、年龄、住院日期、临床分期、手术、放疗、化疗、总生存期等临床数据资料,同时详细记录EAAL治疗的次数、与手术、放疗或化疗联合的情况及EAAL治疗相关不良反应发生的情况等。同时将所有经病理学确诊的、与

EAAL治疗组患者同期入院的(同期入院指的是与EAAL治疗组患者首次入院同一个月)SCLC患者均筛选出来,将既往接受过细胞免疫治疗、ECOG评分>2分、预计生存时间<12周、临床资料不完整的患者剔除,作为对照组初筛的研究对象。根据临床分期将初筛患者分组并编号,通过统计软件SPSS 17.0随机挑选出与不同临床分期的EAAL治疗组数量相同的患者。然后通过查阅病历及随访,详细记录对照组患者的性别、年龄、住院日期、临床分期、手术、放疗、化疗、总生存期等临床数据资料。失访的患者再次剔除,通过统计软件重新随机挑选。

1.2 EAAL体外扩增培养及生物安全性检测

每名EAAL治疗组患者取清晨空腹静脉血20~100mL,然后应用Ficoll-Hypaque法梯度离心分离并获取外周血单个核细胞(PBMCs)。获得的PBMCs经含有500 U/mL IL-2的无血清培养液IMSF100(Immunotech, West Kensington, London)重悬后加入到事先包被有抗-CD₃单抗的无菌培养瓶中,置于至37℃的CO₂细胞培养箱内培养1周。然后将淋巴细胞悬液转移至含1 000 mL无血清培养液IMSF100的CO₂透气培养袋中再培养1周左右。收获培养细胞后的活化淋巴细胞,经100 μm的滤膜过滤后用100 mL含有1%人血清白蛋白的0.9% NaCl将细胞重悬后即可作为免疫效应性细胞治疗回输患者体内。在细胞回输前需应用Limulus Amebocyte Lysate试剂盒(CAPECOD Incorporated, USA)进行内毒素水平的检测。应用台盼蓝法进行培养前后细胞计数及细胞存活率的检测。培养后的细胞总数除以培养前的细胞总数,即得细胞的扩增倍数。

1.3 外周血淋巴细胞及EAAL细胞表型检测

抽取SCLC患者清晨空腹静脉血3~5mL至含有EDTA-Na₂的抗凝管内。用微量移液器(ependorf公司,德国)各取患者EDTA-Na₂抗凝血100~200 μL分别加入到7个流式检测管内。每个血液样本内各加入10 μL的抗CD₈-FITC/CD₄-PE/CD₃-PC₅、CD₃-FITC/CD₅₆-PE/CD₁₆-PC₅、CD₄₅RO-FITC、CD₂₉-FITC、CD₈-FITC、CD₂₅-PE、CD₄₅RA-PE、CD₂₈-PE、CD₁₉-ECD和CD₄-PC₇的荧光素抗体以及上述抗体的同型阴性对照(Bechman-Coulter Company, USA)。经充分混匀后在室温下

避光放置 20 min。然后将含有样本的流式检测管置于 Q-prep 自动溶血仪内,陆续加入 A 液(0.12% 的甲酸溶液)600 μ L, B 液(0.6% 的 Na_2CO_3 、1.45% 的 NaCl 和 3.13% 的 Na_2SO_4 的混合液)265 μ L 以及 C 液(1% 的甲醛溶液)100 μ L,各混匀震荡 15 秒。经处理后的样品在室温下放置 5~10min,待红细胞完全破碎溶血后应用流式细胞仪(Bechman-Coulter Company, USA)进行检测。取总数为 5×10^5 个左右的收获后的 EAAL 细胞,经 PBS 清洗 2 遍后用 2 mL 的 PBS 将细胞重悬。用微量移液器(ependorf 公司,德国)各取重悬后的 EAAL 细胞液 100~200 μ L 分别加入到 7 个流式检测管内。每个细胞样本内同样各加入 10 μ L 的上述的荧光素抗体以及它们的同型阴性对照。混匀后室温下避光放置 20 min,再加入 1 mL 的 PBS 使细胞重悬,应用流式细胞仪(Bechman-Coulter Company, USA)进行检测。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件包,所有正态分布数据均以平均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示;若为非正态数据均以中位数和上下四分位数表示。外周血淋巴细胞及培养后细胞表型的比较采用自身对照 t 检验,相关性分析选用 χ^2 分析或 t 检验。生存率计算选用 Kaplan-Meier 中的乘积极限法,生存分析选用 Kaplan-Meier 方法,单因素显著性检验选择 Log-rank 方法,多因素生存分析选择 COX 回归法,生存时间以中位数表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本特征

根据细胞治疗记录,从 2008 年 5 月至 2010 年 10 月,查找出 23 例接受过 EAAL 治疗的经病理学确诊的 SCLC 患者。按照排除标准将不符合入组条件的患者剔除后共 16 例纳入 EAAL 治疗组。治疗组分为广泛期和局限期 2 个亚组,其中广泛期组 10 例,局限期组 6 例。根据对照组的选择方法,我们从 194 例中随机筛选出符合入组标准的 10 例广泛期和 6 例局限期 SCLC 患者作为对照组。EAAL 治疗组中女性 2 例,男性 14 例,年龄 38~78 岁,中位年龄 59.5 岁;对照组中女性 3 例,男性 13 例,年龄 40~76 岁,中位年龄 60 岁。为了进一步行亚组分析,将患者分为 < 60 岁和 ≥ 60 岁 2 个亚组。治疗组和对照组接受过原发肿瘤手术切除治疗的

患者分别为 1 例和 2 例,接受过放疗的患者分别为 13 例和 14 例,入组时即有脑转移的患者分别为 6 例和 7 例。治疗组和对照组的基本临床特征之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体见表 1。

2.2 EAAL 治疗及化疗情况

EAAL 效应细胞在体外诱导培养成熟后,在化疗的前 1d 经静脉回输至治疗组患者体内。EAAL 治疗前给予盐酸苯海拉明 1mL 肌肉注射预防输液反应。治疗组患者接受 2~23 次 EAAL 细胞免疫治疗(中位治疗次数 6 次)。

治疗组患者行 4~25 周期化疗,对照组行 4~14 周期化疗,两组化疗总周期数分别为 140 周期和 119 周期,两组中位化疗周期数为均为 6 次。为了进一步行亚组分析,根据化疗周期数将患者分为 ≤ 6 周期和 > 6 周期 2 个亚组。

接受的化疗方案包括:CE(依托泊苷+卡铂)、EP(依托泊苷+顺铂)、IP(伊立替康+顺铂)、PP(紫杉醇+顺铂/奈达铂)、DP(多西他赛+顺铂)、CAV(环磷酰胺+表阿霉素+长春新碱)、NP(长春瑞滨+顺铂)、单药培美曲塞、单药多西他赛、

表 1 EAAL 治疗组及对照组 SCLC 患者基本临床特征比较

特征	EAAL 治疗组 (n=16)	对照组 (n=16)	P 值
年龄			
< 60 岁	8	8	1.000
≥ 60 岁	8	8	
性别			
男	14	13	0.626
女	2	3	
分期			
局限期	6	6	1.000
广泛期	10	10	
脑转移			
是	6	7	0.606
否	10	9	
手术			
是	1	2	0.544
否	15	14	
放疗			
是	13	14	0.626
否	3	2	
化疗周期数			
≤ 6	8	9	0.723
> 6	8	7	

单药替莫唑胺胶囊、单药依托泊苷胶囊等。

2.3 EAAL 细胞特征

在倒置显微镜下,在培养的第2天即可观察到细胞的增殖。起初细胞先贴壁生长,随着时间的推移,细胞逐渐变大、变圆,并聚集成团。当细胞成熟时,贴壁并聚集成团的细胞会从培养瓶壁脱落下来成为悬浮状态(图1)。培养至细胞成熟的时间为 (14.10 ± 0.71) d,培养前后细胞总数分别为 $(1.18 \pm 0.38) \times 10^7$ 和 $(6.17 \pm 1.21) \times 10^9$,扩增倍数为 (555.78 ± 142.01) ,细胞存活率为 $97.94\% \pm 0.94\%$ 。收获后EAAL的内毒素、细菌、真菌、支原体和外源病毒检测结果均为阴性。

2.4 培养前后细胞表型变化

经体外培养和增殖后, CD_3^+ 、 $CD_3^+CD_8^+$ 、 $CD_{45}RO^+$ 、 CD_{28}^+ 、 CD_{29}^+ 、 $CD_8^+CD_{28}^+$ 和 $CD3^+CD_{16}^+/CD_{56}^+$ 细胞的比例显著增加($P < 0.01$),而 CD_{19}^+ 、 $CD_3^+CD_4^+$ 、 $CD_{45}RA^+$ 、 $CD_4^+CD_2^+$ 、 $CD_4^+CD_{29}^+$ 和 $CD_3-CD_{16}^+/CD_{56}^+$ (自然杀伤细胞,NK)细胞的比例则明显降低($P < 0.01$),见表2。

2.5 Kaplan-Meier 生存分析

截至本研究的随访终点2012年12月31日,EAAL免疫治疗组中13例(81.25%)死亡,中位OS为17.4个月。对照组患者(100.0%)均死亡,中位OS为10.0个月。所有病人死亡均与肿瘤进展相关。EAAL免疫治疗组的OS长于对照组,但差异无统计学意义($P = 0.06$, $HR = 0.487$, 95%可信区间0.228到1.037,图2)。EAAL免疫治疗组1~3年的生存率分别为81.25%、25.0%和18.75%,而对照组分别为43.75%、6.25%和0%。EAAL免疫治疗组优于对照组,但差异无统计学意义。

2.6 COX 多因素回归分析

结果表明,化疗周期数和EAAL免疫治疗的应用是SCLC患者OS延长的独立预后因素,表3。

2.7 亚组分析

亚组分析的结果见表4。女性亚组患者接受EAAL免疫治疗后的OS要长于对照组(OS分别为19.0和10.0个月, $P = 0.048$)。化疗 ≤ 6 周期亚组患者接受EAAL免疫治疗后的OS也要长于对照组(OS分别为17.4和7.0个月, $P = 0.015$)。但对于其他亚组来说,EAAL治疗组和对照组之间OS差异无统计学意义($P > 0.05$)。

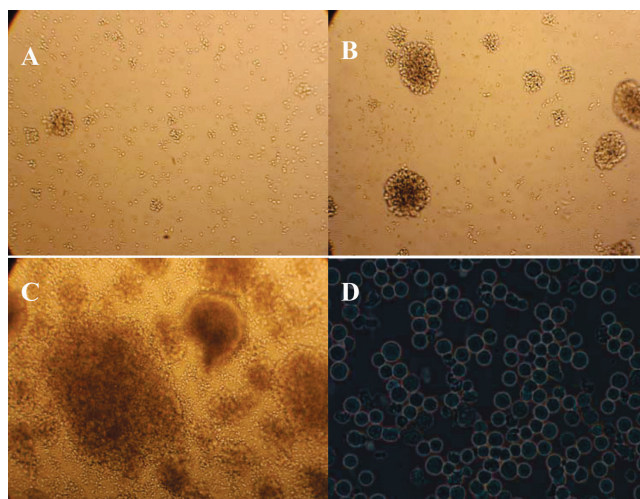


图1 EAAL 细胞体外培养过程观察

A-培养第2天($\times 10$); B-培养第3天($\times 10$); C-培养第7天($\times 10$); D-培养第14天($\times 40$)

表2 培养前后细胞表型变化 $\bar{x} \pm s$

细胞表型	培养前 (%)	培养后 (%)	$P^{1)}$
CD_3^+	69.68 ± 8.98	93.80 ± 6.70	$<0.001^{1)}$
$CD_3^+CD_4^+$	38.78 ± 9.56	13.84 ± 10.01	$<0.001^{1)}$
$CD_3^+CD_8^+$	26.89 ± 8.78	61.51 ± 16.77	$<0.001^{1)}$
$CD_3^+CD_{16}^+/CD_{56}^+$	5.79 ± 4.12	34.48 ± 16.41	$<0.001^{1)}$
$CD_3-CD_{16}^+/CD_{56}^+$	15.02 ± 9.59	4.65 ± 5.93	$<0.001^{1)}$
CD_{19}^+	10.19 ± 5.73	1.00 ± 1.37	$<0.001^{1)}$
CD_{29}^+	66.04 ± 10.69	87.91 ± 11.66	$<0.001^{1)}$
CD_{25}^+	11.78 ± 4.23	13.36 ± 14.81	0.288
$CD_4^+CD_{29}^+$	20.44 ± 5.42	11.47 ± 7.21	$<0.001^{1)}$
$CD_4^+CD_{25}^+$	8.36 ± 3.14	0.73 ± 1.33	$<0.001^{1)}$
$CD_{45}RA^+$	58.57 ± 8.25	11.20 ± 10.80	$<0.001^{1)}$
$CD_{45}RO^+$	49.82 ± 10.28	91.87 ± 12.27	$<0.001^{1)}$
CD_{28}^+	50.12 ± 13.27	54.33 ± 13.56	$0.023^{1)}$
$CD_8^+CD_{28}^+$	12.85 ± 4.71	38.38 ± 11.15	$<0.001^{1)}$
$CD_8^+CD_{28}^-$	19.13 ± 10.26	19.58 ± 9.55	0.737

注:培养后与培养前比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

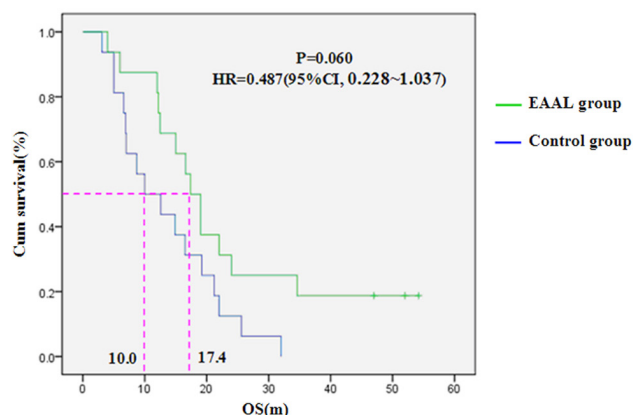


图2 EAAL 治疗组和对照组 OS 比较

表 3 SCLC 患者 COX 多因素回归分析

因素	Wald 值	P 值	风险比 (HR)	HR (95% CI)
性别	0.026	0.872	0.907	0.278~2.957
年龄	0.278	0.598	1.252	0.543~2.885
临床分期	1.565	0.211	1.711	0.738~3.969
手术	2.494	0.114	4.690	0.689~31.928
化疗周期数	5.213	0.022	2.801	1.157~6.783
放疗	3.508	0.061	3.797	0.940~15.337
是否应用 EAAL 细胞免疫治疗	7.674	0.006	3.278	1.415~7.592

表 4 亚组分析

亚组	中位 OS(m)		相对危险度 RR(95% CI)	P 值
	EAAL 组	对照组		
年龄				
< 60 岁 (n=16)	19	10	0.377(0.113,1.259)	0.113
≥ 60 岁 (n=16)	15	8.7	0.568(0.205,1.577)	0.278
性别				
男 (n=27)	16.6	16.5	0.933(0.127,6.876)	0.946
女 (n=5)	19	10	0.428(0.185,0.992)	0.048
临床分期				
局限期 (n=12)	17.4	14.9	0.473(0.141,1.593)	0.227
广泛期 (n=20)	15	6.9	0.437(0.161,1.187)	0.104
放疗				
是 (n=27)	19	12.6	0.521(0.23,1.181)	0.119
否 (n=5)	15	5	0.342(0.03,3.851)	0.385
化疗周期数				
≤ 6 周期 (n=17)	17.4	7	0.14(0.029,0.684)	0.015
> 6 周期 (n=15)	15	21.2	0.852(0.274,2.483)	0.732

2.8 EAAL 治疗安全性分析

在 EAAL 治疗组患者所接受的 107 次 EAAL 回输过程中共发生了 18 例不良事件, 程度均为 1 级或 2 级, 且多为自限性 (表 5)。未出现与 EAAL 治疗相关的肝、肺、肾等重要脏器损伤或自身免疫性疾病的征象。没有 EAAL 治疗相关的死亡事件发生。

表 5 不良反应情况 . n, %

不良事件	患者人数 (n=16) ¹⁾	EAAL 回输次数 (n=107)
发热	3(18.75)	7(6.54)
瘙痒	2(12.50)	3(2.80)
皮疹	1 (6.25)	2(1.87)
头痛	1 (6.25)	2(1.87)
寒战	1 (6.25)	1(0.93)
恶心	1 (6.25)	1(0.93)
心悸	1 (6.25)	1(0.93)
腹泻	1 (6.25)	1(0.93)

注: ¹⁾ 4 名患者出现了 1 种以上的免疫相关不良反应

3 讨论

在肿瘤的发生发展过程中, 肿瘤细胞可采取多种不同的机制来逃避机体的特异性抗肿瘤免疫。肿瘤细胞和宿主的免疫细胞经不断的相互作用后, 患者全身免疫系统及肿瘤具备免疫微环境均可能形成复杂的免疫抑制网络^[18-19]。因此, 通过给患者输注足够数量的具有识别并杀伤肿瘤细胞的功能性淋巴细胞, 是过继性细胞免疫治疗能否成功的基础^[20,21]。既往有研究结果显示, 从无肿瘤负荷的机体中分离、培养并扩增而获得的功能性 T 细胞, 输注到患有某种肿瘤的机体内后, 可以提高后者的抗肿瘤免疫力, 从而打破肿瘤细胞和宿主之间既往形成的病态的免疫抑制状态^[22-23]。因此, 过继性细胞免疫治疗被许多学者认为是继手术、化疗和放疗之后的第四种抗肿瘤措施^[24]。然而, 有些过继性免疫细胞培养扩增方法耗时长, 扩增效率不高, 所获得的抗肿瘤的细胞毒性细胞的数量和细胞毒性效果并不是很理想; 有些功能性细胞在体外可表现出良好的抗肿瘤活性, 但实际的临床效果却并不理想^[25-28]。EAAL 细胞免疫治疗在原发性肝细胞癌 (HCC) 患者已经被证明是安全、有效的^[17]。而且, EAAL 细胞是从患者自体的 PBMCs 中经体外培养扩增而来, 毫无违反医学伦理的风险。

本研究对 EAAL 细胞的表型进行了进一步的研究, 发现 EAAL 细胞中, CD₃⁺ 和 CD₃⁺CD₈⁺ T 淋巴细胞的百分比分别超过了 90% 和 60%, 而 CD₃⁺CD₄⁺ 细胞和 CD₃⁺CD₁₆⁺ / CD₅₆⁺ (NK) 细胞的比例则相对较低。CD₈⁺CD₂₈⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和 CD₃⁺CD₁₆⁺ / CD₅₆⁺ T 淋巴细胞是在抗肿瘤免疫中担负着杀伤肿瘤细胞功能的非常

重要的两类效应性淋巴细胞^[29-31]。这两类细胞在EAAL中所占的比例也非常高(所占百分比分别为 $(38.38 \pm 11.15)\%$ 和 $(34.48 \pm 16.41)\%$)。因此,上述效应性细胞表型在EAAL中的高表达将提高EAAL的抗肿瘤能力。

为初步明确EAAL过继性细胞免疫治疗的实际临床疗效,我们采用了回顾性病例对照研究分析EAAL细胞能否延长SCLC患者的总生存时间。通过对入组研究对象的基本临床特征进行分析后发现,免疫治疗组与对照组之间无统计学差异($P>0.05$),这表明两组的基本临床特征是相似的,具有可比性。因为不同的患者在接受NKTm细胞治疗时的时机各不相同,所以本研究没有分析EAAL免疫治疗与研究对象无病生存期(DFS)或无进展生存期(PFS)的关系,而只是分析了EAAL与患者总生存时间(OS)的关系。Kaplan-Meier生存分析结果显示,接受EAAL细胞治疗的SCLC患者的OS长于对照组患者的OS,但两者之间无统计学差异(OS分别为17.4个月和10.0个月, $P=0.060$, $HR=0.487$, $95\%CI\ 0.228\sim1.037$)。生存率方面,EAAL治疗组1~3年的生存率均要优于对照组,但差异也是无统计学意义($P>0.05$)。治疗组和对照组OS的差异虽然无统计学意义但 P 值接近0.05($P=0.060$),生存曲线两组也有分开的趋势,这可能与本研究入组的研究对象样本量较少(每组仅16例)有关,如果加大样本量可能会得到治疗组OS优于对照组的阳性结果。

COX多因素回归分析结果显示,化疗周期数及是否行EAAL细胞免疫治疗是SCLC患者的独立预后因素。化疗周期数因素HR及其 $95\%CI$ 为2.801($1.157\sim6.783$),表示化疗 >6 周期的患者与化疗 ≤ 6 周期患者相比存活时间更长的可能性提高了2.801倍。是否EAAL免疫治疗的HR及其 $95\%CI$ 为3.278($1.415\sim7.592$),提示接受EAAL免疫治疗的患者与对照组患者相比存活时间更长的可能性提高了3.278倍。亚组分析结果显示,女性、化疗 ≤ 6 周期这两个亚组患者可从EAAL治疗中获益($P<0.05$)。其他亚组的OS也有从EAAL细胞免疫治疗中获益的趋势,但改善不具有统计学意义($P>0.05$)。

就安全性而言,与EAAL相关的最常见的不良反应是发热(6.54%)和皮肤瘙痒(2.80%)。其他不

良反应有皮疹、头痛、寒战、恶心、心动过速和腹泻,但发生率均不超过2%。所有的不良反应都是1级或2,并具有自限性。该结果提示EAAL免疫治疗的安全性良好,不良反应轻微。

总之,本研究所描述的EAAL过继性细胞免疫治疗的体外诱导和增殖方法简单、高效,具有良好的重复性和生物安全性。我们的研究结果表明,EAAL细胞免疫治疗可能会延长SCLC患者的OS,且临床应用不良反应轻微。然而,这项研究仅仅是一个小样本的回顾性病例对照研究,其临床疗效的论证强度还不够强大,在入组研究对象的过程中还可能还存在选择偏倚的影响,且样本量较少,所以还需要大样本的前瞻性队列临床研究来进一步论证本研究的结果。

【参考文献】

- [1] Luo J, Wu F Y, Li A W, et al. Comparison of vinorelbine, ifosfamide and cisplatin (NIP) and etoposide and cisplatin (EP) for treatment of advanced combined small cell lung cancer (cSCLC) patients: a retrospective study [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(9): 4703-4706.
- [2] Chen Y T, Feng B, Chen L B. Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3577-3581.
- [3] Pitini V, Arrigo C, Naro C, et al. Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy in patients with relapsed B-cell lymphoma treated with rituximab [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(18 Pt 1): 5497.
- [4] Kato M, Goto S, Soma G. Lymphokine-activated killer cell therapy combined with high-dose glucocorticoid showed clinical efficacy towards advanced lung carcinoma [J]. Anticancer Res, 2010, 30(8): 3125-3528.
- [5] Ahn Y O, Kim S, Kim T M, et al. Irradiated and activated autologous PBMCs induce expansion of highly cytotoxic human NK cells in vitro [J]. J-Immunother, 2013, 36(7): 373-381.
- [6] Saito S, Harada Y, Morodomi Y, et al. Ex vivo generation of highly purified and activated natural killer cells from human peripheral blood [J]. Hum Gene Ther Methods, 2013, 24(4): 241-252.
- [7] Guo H, Qian X. Clinical applications of adoptive natural killer cell immunotherapy for cancer: current status and future prospects [J]. Onkologie. 2010, 33:389-395.
- [8] Cho D, Shook D R, Shimasaki N, et al. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors [J]. Clin Cancer Res. 2010, 16:3901-3909.
- [9] Ahmed Ali H A, Di J, Mei W, et al. Antitumor Activity of Lentivirus-mediated Interleukin -12 Gene Modified Dendritic Cells in Human Lung Cancer in Vitro [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(2): 611-616.

- [10] Sabado R L, Bhardwaj N. Dendritic cell immunotherapy [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1284: 31-45.
- [11] Besser M J, Shapira-Frommer R, Treves AJ, et al. Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients [J]. *Clin Cancer Res*. 2010, 16:2646-2655.
- [12] Phan GQ, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy [J]. *Cancer Control*, 2013, 20(4): 289-297.
- [13] Yang L, Ren B, Li H, et al. Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small-cell lung cancer patients [J]. *Cancer-Immunol-Immunother*, 2013, 62(1): 65-73.
- [14] Wang X, Yu W, Li H, et al. Can the dual-functional capability of CIK cells be used to improve antitumor effects [J]? *Cell-Immunol*, 2014, 287(1): 18-22.
- [15] Shi S, Wang R, Chen Y, et al. Combining antiangiogenic therapy with adoptive cell immunotherapy exerts better antitumor effects in non-small cell lung cancer models [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65757.
- [16] Sun Z, Shi L, Zhang H, et al. Immune modulation and safety profile of adoptive immunotherapy using expanded autologous activated lymphocytes against advanced cancer [J]. *Clin-Immunol*, 2011, 138(1): 23-32.
- [17] Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomized trial [J]. *Lancet*. 2000, 356 (9232): 802-807.
- [18] Boissonnas A, Licata F, Poupel L, et al. CD8⁺ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(1):85-94.
- [19] Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer?[J]. *Front Immunol*, 2014, 12(5):197.
- [20] Noguchi A, Kaneko T, Naitoh K, et al. Impaired and imbalanced cellular immunological status assessed in advanced cancer patients and restoration of the T cell immune status by adoptive T-cell immunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(1): 90-97.
- [21] Rajbhandary S, Zhao M F, Zhao N, et al. Multiple cytotoxic factors involved in IL-21 enhanced antitumor function of CIK cells signaled through STAT-3 and STAT5b pathways [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(10): 5825-5831.
- [22] Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, et al. Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(8): 1810-1822.
- [23] Vesely M D, Schreiber R D. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1284: 1-5.
- [24] Qian X, Wang X, Jin H. Cell Transfer Therapy for Cancer: Past, Present, and Future. *J Immunol Res*. 2014, 2014:525913.
- [25] Kelderman S, Schumacher TN, Haanen JB. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(6):1132-1139.
- [26] Binsfeld M, Fostier K, Muller J, et al. Cellular immunotherapy in multiple myeloma: Lessons from preclinical models [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2):392-404.
- [27] Weber J S. At the bedside: adoptive cell therapy for melanoma-clinical development [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(6):875-882.
- [28] Yu X, He J, Mongkhoun S, et al. Artificial antigen-presenting cells plus IL-15 and IL-21 efficiently induce melanoma-specific cytotoxic CD8⁺ CD28⁺ T lymphocyte responses [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(6):467-472.
- [29] Wang E, Zhang Q, Liu X, et al. The dual-functional capability of cytokine-induced killer cells and application in tumor immunology [J]. *Hum Immunol*, 2014, pii: S0198-8859(14)00461-3.
- [30] Jäkel C E, Vogt A, Gonzalez-Carmona MA, et al. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of gastrointestinal tumors [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014:897214.
- [31] Hara M, Matsuzaki Y, Shimizu T, Tomita M, Ayabe T, Enomoto Y, et al. Preoperative peripheral naïve/memory ratio and prognosis of non small-cell lung cancer patients. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 13:384-390.