

含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2 方案治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤

杨洋¹, 杨波¹, 脱帅², 卢学春¹, 朱宏丽¹, 脱朝伟², 蔡力力¹, 迟小华³, 于睿莉¹, 陈云燕⁴, 张文英¹, 刘洋¹, 王瑶¹, 代汉仁¹, 韩为东¹, 张峰⁵, 姚善谦¹

¹解放军总医院 南楼血液科, 北京 100853; ²解放军第 202 医院, 沈阳 110003; ³解放军第二炮兵总医院 药学部, 北京 100800; ⁴解放军第二炮兵 后勤部保健办, 北京 100800; ⁵中国科学院北京基因组研究所, 北京 100029

摘要: **目的** 评价含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2(TCIL-2) 方案治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤的有效性和安全性。**方法** 采集预先接受胸腺五肽免疫增强治疗的 4 例高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者外周血单个核细胞, 在体外经干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-2(IL-2)、抗 CD3 单克隆抗体诱导成 CIK 细胞, 回输细胞数为 2×10^9 - 3×10^9 个, 回输后应用 IL-2 100mU/d, 皮下注射, 连续 10d。28d 为 1 个周期, 共完成 24 个周期的自体 CIK 细胞输注。观察治疗前后细胞免疫功能、肿瘤相关生物学指标变化。**结果** 2 例接受 8 个周期的 CIK 细胞输注, 2 例接受 4 个周期的输注, 回输后所有患者未出现不良反应。CIK 细胞治疗后 CD3⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 细胞比例明显升高 ($P < 0.05$), β 2 微球蛋白水平显著下降 ($P < 0.05$)。3 例达完全缓解, 1 例完成 8 周期的 CIK 细胞输注后一度达良好的部分缓解, 但最终因急性心肌梗死和淋巴瘤持续进展而死亡。**结论** 自体 CIK 细胞联合 IL-2 治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤安全有效。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞; 胸腺肽; 淋巴瘤; 弥漫大 B 细胞; 老年人

中图分类号: R 733.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1139(2012)05-0441-04

Treatment of diffuse large B cell lymphoma with combined thymic peptide- enhanced autologous cytokine induced killer cells and IL-2 in aged patients

YANG Yang¹, YANG Bo¹, TUO Shuai², LU Xue-chun¹, ZHU Hong-li¹, TUO Chao-wei², CAI Li-li¹, CHI Xiao-hua³, YU Rui-li¹, CHEN Yun-yan⁴, ZHANG Wen-ying¹, LIU Yang¹, WANG Yao¹, DAI Han-ren¹, HAN Wei-dong¹, ZHANG Feng⁵, YAO Shan-qian¹

¹Department of Geriatric Hemo, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Chinese PLA 202 Hospital, Shenyang 110003, Liaoning province, China; ³Department of Pharmacy, General Hospital of Chinese PLA Second Artillery Forces, Beijing 100800, China; ⁴Health Care Office, Logistics Department, Chinese PLA Second Artillery Forces, Beijing 100800, China; ⁵Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China

Corresponding authors: ZHU Hong-Li. Email: bjzhl202_cn@sina.com; LU Xue-chun. Email: luxuechun@126.com

Abstract: Objective To assess the efficiency and safety of combined thymic peptide-enhanced autologous cytokine induced killer (CIK) cells and IL-2 in treatment of diffuse large B cell lymphoma in aged patients. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from 4 aged patients with diffuse large B cell lymphoma. CIK cells were induced with in vitro interferon gamma (IFN- γ), IL-2 and anti-CD3 monoclonal antibody (mAb). Immune function of the cells and tumor-related biological indexes of the patients were observed after 2×10^9 - 3×10^9 autologous CIK cells were re-transfused into the patients each time and IL-2 100mU/d was subcutaneously injected for 10 days, 28 days a cycle for 24 cycles. **Results** Two patients received 8 cycles of CIK cells transfusion and 2 patients received 4 cycles of CIK cells transfusion. No adverse reaction occurred in them. The number of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ was significantly greater and the serum β 2-microglobulin level was markedly lower after CIK cells transfusion than before CIK cells transfusion ($P < 0.05$). Complete remission was achieved in 3 patients and 1 patient died of acute large-area myocardial infarction and persistent progression of lymphoma although partial remission was achieved after 8 cycles of CIK cells transfusion. **Conclusion** Combined autologous CIK cells transfusion and IL-2 is safe and effective for large B cell lymphoma in aged patients.

Key words: cytokine induced killer cells; thymosin; lymphoma; diffuse large b cell lymphoma; aged

收稿日期: 2011-09-07

修回日期: 2011-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772597); 解放军总医院科技创新苗圃基金 (11KMM24); 中央保健研究基金 (B2009B115); 科技部新药创制重大专项 (2008ZXJ09001-019)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772597)

作者简介: 杨洋, 女, 硕士, 医师。研究方向: 老年血液肿瘤。

Email: yangyangbj1022@163.com

通信作者: 朱宏丽, 女, 博士, 主任医师, 主任。Email: bjzhl202_cn@sina.com; 卢学春, 男, 博士, 主任医师。Email: luxuechun@126.com

com

细胞因子诱导的杀伤 (cytokine induced killer cell, CIK) 细胞是一种新的抗肿瘤过继细胞免疫治疗, 且已在多种类型恶性肿瘤治疗中取得了一定疗效^[1-3]。

但 CIK 细胞能否用于治疗老年恶性淋巴瘤, 它与化放疗联合的模式以及作为老年恶性淋巴瘤整体治疗中辅助治疗方法的最佳方案还需更深入探讨。

本文报告我科 2008 年 8 月-2009 年 11 月采用含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2(TCIL-2) 方案成功治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤 4 例。

资料和方法

1 临床资料 2008 年 8 月-2009 年 11 月我科收治的 4 例高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者, 其中男 3 例, 女 1 例, 年龄 84-90 岁, 4 例患者治疗前均接受过多疗程化疗, 疾病达不确定的完全缓解 (complete remission uncertain, CRu) 或部分缓解 (partial remission, PR)。病例相关资料见表 1。恶性淋巴瘤组织学分类标准采用 2001 年 WHO 造血淋巴组织分类方法^[4], 分期采用 Ann Arbor 临床分期法, 疗效评价依据国际工作组标准 IWC (即 Cheson 标准)^[5]。

2 CIK 细胞制备 患者签署知情同意后, 晨起空腹采集外周静脉血 54ml, 分离单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 用无血清培养基调整细胞浓度, 在每毫升细胞悬液中加入 rhIFN- γ 2000U, 置于透气性培养袋中 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 悬浮培养, 第 2 天加 rhIL-2 1000U/ml, anti-CD3 McAb 50ng/ml, 分别于培养后的第 4、7、10、13 天进行细胞表型分析。需符合如下标准: CD3⁺ 细胞比例 >70%, CD8⁺ 细胞比例 >40%, CD3⁺CD56⁺ 细胞比例 \geq 30%。用苔盼兰染色法检测细胞活力并计数, 培养第 14 天回输给患者。

3 含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2 (TCIL-2) 方案 采集 PBMC 之前 1 周开始给予胸腺五肽注射液 20mg/d, 肌肉注射, 连用 1 周。然后采集 PBMC 后胸腺五肽注射液改为 20mg, 3 次/周。CIK 细胞联合 rhIL-2 方案定义为: 每次回输 CIK 细胞数量在 2×10^9 - 3×10^9 个, 每疗程连续回输 2

次, 回输后皮下注射 rhIL-2(100mU/0.9ml/瓶, 北京四环制药公司)100mU/d, 连用 10d。在距上一疗程回输 14d 后进行下一疗程采血以及制备细胞。

4 主要观察指标 1) 一般情况: CIK 细胞治疗前后观察患者一般状况的改变; 2) 肿瘤相关生物学指标: 治疗期间每 2 周抽血查 β 2 微球蛋白, 动态观察变化; 3) 细胞免疫反应: CIK 细胞治疗前后均复查外周血 T 淋巴细胞亚群变化。4) 影像学检查: 在患者行 CIK 细胞治疗前、4 个疗程后、8 个疗程后做全身 PET-CT 检查。

5 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析, 组间均数比较采用独立样本 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 培养前后效应细胞表型变化 外周血淋巴细胞扩增培养平均时间为 (14.19 \pm 1.5)d, 扩增倍数为 465 \pm 176.32; 细胞培养成熟时所得淋巴细胞数为 (3.8 \pm 0.72) $\times 10^9$, 细胞存活率为 97.42% \pm 1.38%。

2 一般情况及疾病总体反应率 所有患者于 CIK 细胞治疗 2 个疗程后一般情况改善明显, 主要表现为乏力减轻、精神状态改善、食欲增强。在经过 8 个疗程治疗后, 1 例患者由 CRu 达到 CR; 2 例患者治疗前 PR, 接受 4 个疗程 CIK 细胞治疗后为 CR; 1 例接受 8 个疗程 CIK 细胞治疗, 疾病进展一度得到控制, 但此后因急性大面积心肌梗死, 继之淋巴瘤广泛播散而死亡 (表 1)。

3 CIK 细胞回输前、后淋巴细胞亚群的变化 CIK 细胞回输后 8-10d 复查外周血淋巴细胞亚群, 结果表明, CD3⁺、CD3⁺CD8⁺ 及 CD3⁺CD56⁺ 细胞的比例显著增多 (表 2)。

4 淋巴瘤相关生物学指标变化 CIK 细胞治疗前

表 1 4 例高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者临床资料

Tab 1 Clinical data about 4 old patients with diffuse large B cell lymphoma

No.	Gender	Age (year)	Pathological diagnosis	Initial stage	Comorbidity	Previous treatment	Disease state before CIK cell treatment	Courses of CIK cell treatment	Disease state after CIK cell treatment	Survival time (month)
1	Female	84	Splenic DLBCL (large mass type)	IV B	Hypertension, CAD, PAC, hepatitis C, DVT, bilateral lungs infection	R-CVP \times 1; modified R-CHOP \times 2; temozolomide \times 2	PR	8	Die from AFI after cold and tumor progression	10
2	Male	87	DLBCL	III A	CAD, cerebral infarction, paroxysmal atrial fibrillation, DVT, low potential malignant nodule of right upper lung	CHOP \times 8; IFN maintenance for 84 months; radiotherapy \times 2 after partial recurrence; R \times 2	CRu	8	CR	156
3	Male	90	DLBCL	III A	Hypertension, CAD, frequent PAC, COPD, PHD	R-CVP \times 1; R \times 1; temozolomide \times 1	PR	4	CR	12
4	Male	88	Gastric DLBCL	IV B	Hypertension, CAD, diabetes mellitus, bilateral pulmonary interstitial fibrosis	Partial radiotherapy \times 1; CVP \times 2; R-CHOP \times 1	PR	4	CR	8

后复查 $\beta 2$ 微球蛋白水平, 结果表明, $\beta 2$ 微球蛋白水平 (正常值 0-0.18mg/dl) 较回输前显著下降 (图 1)。

表 2 CIK 细胞回输前、后患者外周血淋巴细胞亚群变化
Tab 2 Changes of lymphocytic subgroup of peripheral blood before and after CIK cells transfusion ($\bar{x} \pm s, \%$)

CIK cells	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
Before transfusion	44.5 \pm 8.2	24.3 \pm 6.8	3 \pm 1.6
After transfusion	60.4 \pm 8.6 ^a	40.2 \pm 4.6 ^a	13 \pm 2.8 ^a

^aP<0.05, vs pre-transfusion

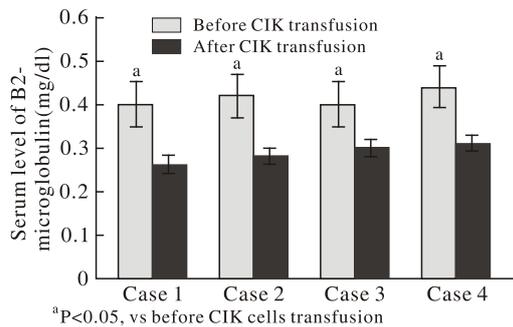


图 1 CIK 细胞输注前后患者 $\beta 2$ 微球蛋白水平变化

Fig 1 $\beta 2$ microglobulin levels before and after CIK cells transfusion

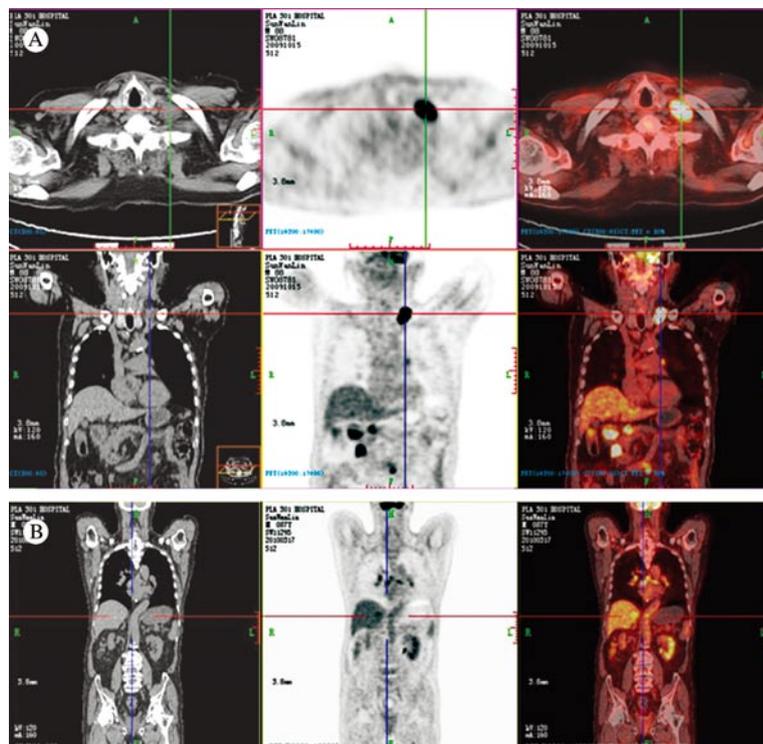


图 2 病例 4 CIK 治疗前后的影像学特征

A: CIK 治疗前, 图示左侧锁骨下肿大淋巴结, 放射性摄取增高, SUV 值为 8.7; B: CIK 治疗 4 个疗程后, PET/CT 扫描全身未见异常高摄取病灶。

Fig 2 Image features of case 4 before and after autologous CIK cells transfusion

A: PET/CT showing enlarged lymph nodes with hypermetabolism in the left clavicle before CIK cell treatment. (SUV value of A:8.7); B: PET/CT showing no abnormal hypermetabolism after 4 courses of autologous CIK cells transfusion

5 影像学特征变化 文中 4 例患者在 CIK 治疗前后均接受全身 PET-CT 检查, 病例 4 观察到 CIK 治疗前后的特征性影像学改变: CIK 治疗 4 个疗程后患者肿大的淋巴结消失, PET/CT 扫描全身未见异常高摄取病灶, 证实为完全缓解 (图 2)。

讨论

DLBCL 是成人最常见的淋巴瘤类型, 约占全部 NHL 的 31%^[6], 在亚洲国家比例更高, 约为 40% 以上^[7], 属于侵袭性淋巴瘤。由于社会的老龄化, 高龄 DLBCL 患者的发病率呈增加趋势, 由于其造血和各器官功能退化, 通常无法耐受化疗所致的心脏毒性、血液学毒性等不良反应, 且易复发, 预后差。本文 4 例患者确诊为 DLBCL, 同时这些患者均罹患多种慢性疾病, 以高血压、冠心病和慢性阻塞性肺疾病最常见, 而且均已经过了多个疗程的常规化疗, 患者精神食欲差, 骨髓抑制明显, 无法耐受进一步的化疗。而目前细胞因子诱导的杀伤细胞是抗肿瘤过继细胞免疫治疗最有效的方案。CIK 是一群异质性免疫细胞, 主要效应细胞同时表达 CD3 和

CD56 两种膜蛋白分子, 兼具有 T 淋巴细胞的抗癌活性和 NK 细胞非 MHC 限制性杀瘤特点, 杀瘤活性显著高于 LAK 细胞。已经证实 CIK 细胞对于急性髓细胞白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤等多种恶性血液系统肿瘤有效。我们在治疗中采取的策略是在患者化疗后获得至少部分缓解的基础上, 对其采用 TCIL-2 细胞治疗方案, 以达到清除肿瘤微小残留灶、预防肿瘤复发、提高患者生活质量的目的。

本组 4 例高龄 DLBCL 患者的外周血单个核细胞经体外刺激培养后, 扩增倍数、淋巴细胞亚群及回输细胞数均达到了 CIK 细胞临床治疗标准^[8]。进一步观察表明, CIK 细胞治疗后, 患者一般情况得到明显改善, 精神和体力都得到明显恢复。为观察 TCIL-2 细胞治疗方案疗效, 我们通过定期监测淋巴瘤相关生物学指标 $\beta 2$ 微球蛋白、外周血淋巴细胞亚群和全身 PET-CT 检查进行评估。结果发现, 随着 CIK 细胞疗程数增加, $\beta 2$ 微球蛋白水平逐渐下降; 外周血淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 治疗后均升高; PET/CT 评估表明,

(下转 459 页)

(上接443页)

1 例由治疗前 CRu 达到 CR, 2 例由治疗前 PR 转为 CR。其中 1 例接受 CIK 细胞治疗后疾病进展曾得到很好的控制, 但由于后期发生急性大面积心肌梗死以及淋巴瘤持续进展而死亡。综上所述, 含胸腺肽免疫增强的自体 CIK 细胞联合 IL-2 治疗高龄弥漫大 B 细胞淋巴瘤有效, 无明显不良反应, 安全性好, 为老年 B 细胞性恶性淋巴瘤的生物治疗提供了一种新的选择。

参考文献

- 1 Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal Cancer, colorectal Cancer and lymphoma [J]. Br J Cancer, 1999, 81 (6): 1009-1016.
- 2 Zhou P, Liang P, Dong B, et al. Phase I clinical study of combination therapy with microwave ablation and cellular immunotherapy in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11 (5): 450-456.
- 3 Olioso P, Giancola R, Di Riti M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial [J]. Hematol Oncol, 2009, 27 (3): 130-139.
- 4 Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery [J]. Blood, 2008, 112 (12): 4384-4399.
- 5 Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas [J]. J Clin Oncol, 1999, 17 (4): 1244.
- 6 Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma [J]. Oncogene, 2004, 23 (38): 6524-6534.
- 7 张彦宁, 周小鸽, 张淑红, 等. 非霍奇金 B 细胞淋巴瘤 369 例病理形态观察 2001 年世界卫生组织淋巴组织肿瘤新分类应用体会 [J]. 中华病理学杂志, 2005, 34 (4): 193-197.
- 8 Weng DS, Zhou J, Zhou QM, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas [J]. J Immunother, 2008, 31 (1): 63-71.