

[27] Döring B, Pfitzer G, Adam B, et al. Ablation of connexin43 in smooth muscle cells of the mouse intestine; functional insights into physiology and morphology[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(2):333-342.

[28] Sanders KM, Koh SD, Ro S, et al. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(11):633-645.

[29] Zarate N, Wang XY, Tougas G, et al. Intramuscular interstitial cells of Cajal associated with mast cells survive nitroergic nerves in achalasia[J]. Neurogastroenterol Motil, 2006, 18(7):556-568.

[30] Struijs MC, Diamond IR, Pencharz PB, et al. Absence of the interstitial cells of Cajal in a child with chronic pseudoobstruction[J]. J Pediatr Surg, 2008, 43(12):e25-29.

(收稿日期:2013-08-28 修回日期:2013-10-25)

· 综 述 ·

CIK 治疗肝病研究进展*

安 选, 钟 庆 综述, 巫贵成[△] 审校
(重庆市三峡中心医院肝病中心 404000)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 肝炎, 丙型; 肝肿瘤; CIK 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.06.043 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)06-0745-03

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 病程发展快, 患者就诊时往往已是中晚期, 目前尚无根治或特效的治疗方案。现阶段手术、肝动脉栓塞化疗、局部消融是针对肝癌的主要治疗手段, 但是术后复发率高、生存质量降低、对免疫系统造成的损害等使得目前的各种治疗手段仍无法从根本上改变肝癌的预后, 亟待研究更为有效的方法用于肝癌的治疗。

众所周知, 乙型肝炎、丙型肝炎是肝癌最重要的病因之一, 而我国乙型肝炎病毒携带者比例高, 有着庞大的乙型肝炎感染发病人群。抗病毒治疗是治疗慢性乙型肝炎和丙型肝炎的关键, 但目前抗病毒治疗方案存在如下缺陷: (1) 目前针对慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗的药物虽多, 但疗效均不满意; (2) 虽然针对慢性丙型肝炎制定了规范的干扰素联合利巴韦林治疗方案, 但对于应答不佳、无应答以及无适应证的患者目前尚无确切的治疗方法。近年来人们尝试将细胞过继免疫疗法应用于抗病毒治疗并取得了一定的疗效, 其中 CIK 具有高增殖活性、高细胞毒力和不良反应小等优点而逐渐取代其他细胞免疫疗法, 并应用于病毒性肝炎的治疗。

1 CIK 的来源

目前 CIK 主要是从外周血(自体或异体)、脐血、骨髓中获得。肝癌患者自体 CIK 和正常人 CIK 一样对肝癌细胞具有很强的细胞毒作用, 而且自体 CIK 治疗可避免由于交叉感染引发的其他疾病, 安全性得到了极大提高。研究显示, 脐血来源 CIK 在体外培养过程中 CD3、CD56、CD4、CD8 等免疫表型与成年人外周血来源 CIK 相似, 对不同的肿瘤细胞的杀伤活性也与成年人外周血相似, 均随着效靶比的增高而逐渐增强^[1]。但是脐血 CIK 与肿瘤细胞作用后发生坏死的细胞相对较多, 而外周血来源 CIK 则发生凋亡的细胞相对较多^[2]。骨髓来源的 CIK 增殖能力较外周血来源的 CIK 稍差, 但仍有较高的增殖能力, 在细胞毒性方面与外周血相比差异无统计学意义^[3]。异体正常供者来源 CIK 杀伤率高, 但取材困难, 交叉感染可能

性大, 移植排斥反应较大, 目前主要用于研究。

2 CIK 表型与活性

CIK 在肝脏中分布最多, 占肝内 T 细胞的 (23.6 ± 4.1)%, 其次为外周血 (<5%)。CIK 的起源目前尚未完全清楚。CIK 为多种细胞因子诱导产生的异质细胞群, 经诱导后高度表达 CD3、CD54、CD11a, 中度表达 CD3、CD56、HLA-DR、CD28、CD54、CD28, 不表达 CD86、CD80, 因而由多种细胞亚群构成^[4]。其中 CD3⁺CD56⁺ 亚群为增殖倍数最多, 杀瘤活性最强的亚群。近年来关于成年人 CIK 体外培养过程的报道显示, CD8⁺ 细胞比率随着 CIK 的培养而增加, 而 CD4⁺ 细胞比率则减少, 自然杀伤细胞 2D (NKG2D) 在 CIK 高表达^[5]。NKG2D 是细胞激活标志物, 在 T 细胞和 NK 细胞都有表达, 此抗原的表达可以反映出效应细胞的激活及溶细胞能力。

3 CIK 体外扩增

在体外培养条件下, 通过加入细胞因子如干扰素 (IFN)- γ 、IL-1、IL-2、CD3 单抗等, 经过 14~21 d 体外培养, CIK 比例可由 0.10%~0.13% 上升至 19.0%~20.5%, 细胞数量增加平均达 250 倍 (2.2~525.0 倍)。研究显示, 同健康者的 CIK 相比, 肝癌患者 CIK 的增殖速度较慢且增殖倍数也有所降低, 为提高 CIK 体外增殖能力, 近年来有学者对常规的 CIK 培养方案进行了优化。赵楠等^[6]证实人源 IL-21 可增强外周血来源 CIK 细胞抗白血病作用; 秦莉等^[7]发现 IL-12 可以显著增强 CIK 细胞的增殖能力和细胞毒性。但这些优化方案尚需要临床研究进一步证实。

4 CIK 抗肿瘤及病毒的作用机制

CIK 很强的细胞毒活性源于其较高的存活率和较强的增殖能力。CIK 的杀瘤机制还不完全明确, 但是涉及的一些分子和途径已经确定。目前研究认为 CIK 可能通过如下机制发挥抗肿瘤作用: (1) 通过黏附因子 LFA/ICAM-1 途径与肿瘤细胞相互结合后, 能够分泌含有大量 BLT 酯酶的细胞质颗粒, 这些

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (csts2012jjA10110)。

作者简介: 安选 (1978—), 主治医师, 硕士, 主要从事病毒性肝炎和生物治疗。

[△] 通讯作者: Tel: 13896208811; E-mail: wuguic@hotmail.com。

颗粒能够直接穿透封闭的靶细胞膜进行胞吐,从而导致肿瘤细胞的裂解。(2)抗体封闭 NKG2D 分子研究、siRNA 实验以及重定向的细胞溶解均表明,大部分 CIK 的主要组织相容性复合体(MHC)非限制性细胞毒作用是 NKG2D 介导的^[8]。但是 NKG2D 只是作为 CIK 与肿瘤靶细胞作用的中间体,最终的细胞溶解作用是通过穿孔素与颗粒酶达到的。(3)CIK 也可诱导肿瘤细胞凋亡,通过活化肿瘤细胞凋亡基因,使 FLIP、Bcl-2、Bcl-xL、DADI 和 survivin 基因表达上调^[9]。(4)CIK 自身还能分泌 IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子 α 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子,提高细胞不良反应,不仅对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可通过调节机体免疫系统反应性间接杀伤肿瘤细胞。

同样,由于 CIK 具有非 MHC 限制性、高增殖活性、高细胞毒力以及细胞来源丰富等优点,目前已经开始试用于治疗病毒感染性疾病如慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎等。CIK 抗病毒的可能机制如下:(1)抗 CD3 单克隆抗体以及 IL-2 等细胞因子可以直接活化细胞毒性 T 淋巴细胞,发挥直接杀伤作用;(2)T 淋巴细胞活化后大量分泌 Th1 类细胞因子发挥杀伤效应。CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD56⁺ 细胞分泌的大量促炎因子,包括 IFN- γ 、IL-6,还具有重新调动免疫学反应的作用。IFN- γ 可以作用于被感染的肝细胞,通过一系列细胞内信号途径,抑制病毒在肝细胞内的复制过程。

5 CIK 用于治疗肝病的临床研究

5.1 CIK 治疗原发性肝癌

5.1.1 单独 CIK 治疗 目前大量研究报道 CIK 在治疗肝癌方面具有良好的应用前景。报道显示,健康者的 CIK 体外增殖后具有显著的抗移植瘤(肝癌细胞)活性^[10]。肝癌患者自体 CIK 回输后患者外周血中 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 和 CD25⁺ 细胞比例升高,其中 CD3⁺CD56⁺ 细胞升高明显,可持续维持较高水平;同时其外周血中 DC1 和 DC2 比例显著升高,从而证实 CIK 治疗可通过直接杀伤肿瘤细胞和提高机体免疫功能两方面来抑制肿瘤的生长。因而,对于不能接受手术、放化疗的中晚期肝癌患者,CIK 治疗可延长生存期,改善生活质量。这些表明 CIK 治疗可能成为中晚期肝癌安全有效的新途径。

5.1.2 CIK 联合手术及微创治疗 对早期肝癌切除患者,CIK 治疗可消除术后残留肿瘤细胞,提高机体免疫力,降低术后肝癌复发率,改善患者生活质量。Takayama 等^[11]对手术切除后的 76 例肝癌患者联合 CIK 治疗,与 74 例仅行手术治疗的肝癌患者比较,治疗组复发率较对照组下降了 18%,3、5 年无复发率明显高于对照组,表明 CIK 治疗可降低肝癌患者术后复发,延长术后生存时间。一项来自于国内的报道观察了微创治疗(肝动脉化疗栓塞和射频消融)后联合 CIK 治疗的疗效,发现联合 CIK 治疗后患者 CD3⁺、CD4⁺、CD56⁺(NK)效应细胞的比例及 CD4⁺/CD8⁺ 比例较未联合 CIK 组显著上升,生存率明显提高,证实 CIK 治疗在提高肝癌患者免疫功能、降低肝癌复发率和提高生存率方面发挥了重要作用^[12]。目前,CIK 被综合运用在肿瘤治疗中,特别是临床上评价肿瘤达到完全缓解和达到根治性去除肿瘤负荷之后,被认为是预防肿瘤复发的较好方法之一。

5.1.3 CIK 联合树突状细胞(DC)治疗 DC 是目前已知人体内最主要、功能最强大的抗原呈递细胞,将具有高效抗肿瘤活性的 CIK 和具有强大肿瘤抗原递呈功能的 DC 共同培养,无疑

会增加 CIK 对肿瘤细胞的特异杀伤活性,有望成为肿瘤过继免疫治疗的首选方法。体外研究提示 CIK 联合 DC 可明显抑制肝癌 HepG2 细胞系的生长,显著诱导该细胞凋亡^[13]。负载肿瘤抗原的 DC 致敏 CIK 后对肝癌细胞 SMMC-7721 的杀伤活性明显提高,将上述细胞回输给中晚期肝癌患者,治疗后大多数患者短期内血清甲胎蛋白(AFP)下降,食欲、体力、睡眠改善,疼痛减轻,卡氏评分提高,部分患者病灶缩小,而且不良反应小,安全有效^[14],显示 CIK 联合 DC 在肝癌的综合治疗中具有良好的应用前景。

5.1.4 CIK 与溶瘤病毒的联合应用 国外有学者将编码人 AFP 的腺病毒 Ad-hAFP 转导至肝细胞癌患者的 DC 中,然后和自体 CIK 共培养,分析杀伤肝癌细胞的能力。结果表明被转导的 DC 刺激 CIK 可融解 70% 表达 AFP 的癌细胞,较之未转导 DC 诱导的 CIK,细胞毒性明显增强^[15],成功诱导产生了 AFP 特异性的免疫反应。随着肿瘤发病机制和病毒学研究的进展,利用溶瘤病毒联合 CIK 进行肿瘤治疗的方法,将成为发展前景广阔的抗肿瘤策略。

5.2 CIK 治疗慢性乙型肝炎

5.2.1 单纯 CIK 治疗 目前治疗慢性乙型肝炎的药物主要是 IFN- α 及核苷类药物(如拉米夫定和阿德福韦等),但疗效均不甚理想。体外试验发现,加入纯化乙型肝炎表面抗原(HBsAg)共培养后,可以诱 CIK 产生特异性杀伤作用。研究表明,CIK 通过体外扩增诱导培养方案可以提高培养体系中 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 细胞的比例,增强其分泌 IFN- γ 和脱颗粒(CD107a)的能力,过继回输 CIK 之后,慢性乙型肝炎患者体内的病毒载量显著降低^[16]。汤紫容等^[17]对未经抗病毒药物及其他免疫治疗的慢性乙型肝炎患者 16 例进行自体 CIK 回输治疗,结果 9 例患者产生病毒学应答,乙型肝炎病毒 DNA 水平分别于第 4、12、24 周出现明显降低,同时应答者体内浆样树突状细胞(pDCs)频率上升,证实了 CIK 治疗后乙型肝炎病毒 DNA 复制明显受到抑制,进一步分析其机制可能部分通过提高 pDCs 频率实现。对于乙型肝炎病毒引起的肝硬化患者,经过自体 CIK 回输治疗后,肝硬化患者体内乙型肝炎病毒 DNA 亦明显被抑制^[18]。

5.2.2 CIK 联合其他治疗 研究发现,慢性乙型肝炎患者单核细胞来源的 DC 受到乙型肝炎病毒感染后,表现为抗原提呈功能下降,辅助 T 细胞反应受损。提示乙型肝炎病毒感染可抑制 DC 功能,减弱 DC 抗原提呈功能及其分泌细胞因子的能力,使乙型肝炎病毒感染持续。将 HBsAg 致敏的 DC 与 CIK 共同培养,可诱导出 HBsAg 特异性 CIK,增强各自的疗效。Shi 等^[19]研究发现,CIK 联合 DC 细胞治疗慢性乙型肝炎患者可明显降低乙型肝炎病毒 DNA 载量。近年来有人提出 CIK 和 DC 联合 IFN 治疗以观察临床疗效,结果显示,DC 和 CIK 联合组治疗后丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、乙型肝炎病毒 DNA 定量、HBsAg 定量均明显下降,而 DC、CIK、IFN 三者联合组下降更明显,疗效更佳^[20]。进一步证明 CIK 直接抗病毒以及细胞免疫重建的作用,为慢性乙型肝炎的治疗开辟了新的途径。

5.3 CIK 治疗慢性丙型肝炎 目前慢性丙型肝炎的治疗标准方案为 IFN- α 加利巴韦林,使得持久病毒应答率有了很大的提高,但是治疗结果仍不理想,两者不良反应较大,且因为 IFN 的使用禁忌限制,对于丙型肝炎引起的失代偿期肝硬化患者抗

病毒治疗则无能为力。近年来人们开始了 CIK 治疗慢性丙型肝炎的尝试。童春容等^[21]首次对 CIK 治疗急性淋巴细胞白血病合并肝炎的临床效果进行了报道。12 例在进行 CIK 回输前体内的丙型肝炎病毒 RNA 阳性,经 CIK 治疗后,9 例丙型肝炎 RNA 持续转为阴性。另有 6 例 CIK 治疗前肝功能异常,经 CIK 治疗后其肝功能明显好转。自体 CIK 回输治疗慢性丙型肝炎有较好的近期疗效及较高的安全性,为进一步开展丙型肝炎的免疫治疗奠定了基础。

6 展 望

CIK 具有广谱的抗肿瘤效应和抗病毒、免疫调节等多项生物活性功能,是一种新的有效的肿瘤治疗手段。目前大多报道显示 CIK 在肝癌及病毒性肝炎等肝病领域具有良好的应用前景。CIK 与手术、肝动脉化疗栓塞术介入、局部消融等结合治疗的应用将会使人们对于肝癌的治疗前景充满期待。而 CIK 联合 DC,与有溶瘤病毒作用的病毒结合,CIK 耐药基因转染,CIK 细胞的基因修饰等方面的研究则有望克服靶向治疗中存在的递呈及定向方面的难题,将使 CIK 成为更有效的治疗手段。随着基础研究及临床应用的深入,以 CIK 为主或 CIK 结合其他治疗的方案将为肿瘤和病毒性疾病患者带来新的希望。

参考文献:

- [1] Ayello J, van de Ven C, Cairo E, et al. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(10): 1216-1229.
- [2] 王家祥, 郑树, 刘秋亮. 不同来源 CIK 细胞的体外扩增和杀伤活性的比较 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(7): 616-618.
- [3] Nishimura R, Baker J, Beilhack A, et al. In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2563-2574.
- [4] Linn YC, Lau SK, Liu BH, et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell [J]. *Immunology*, 2009, 126(3): 423-435.
- [5] Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers [J]. *Int Immunol*, 2008, 20(7): 841-848.
- [6] 赵楠, 赵明峰, Rajbhandary S, 等. 人源 IL-21 增强细胞因子诱导杀伤细胞抗白血病作用及其机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(10): 823-828.
- [7] 秦莉, 王志华, 袁玉涛, 等. IL-12 对 CIK 细胞体外增殖及细胞毒活性影响的研究 [J]. *国际免疫学杂志*, 2007, 30(4): 203-207.
- [8] Verneris MR, Karami M, Baker J, et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells [J]. *Blood*, 2004, 103(8): 3065-3072.
- [9] Sun S, Li XM, Li XD, et al. Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MGC-803 gastric Cancer cell lines [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(2): 173-180.
- [10] Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, et al. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(7): 831-840.
- [11] 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(9232): 802-807.
- [12] 黄丽惜, 周启明, 夏建川. 微创联合自体 CIK 细胞治疗原发性肝癌的安全性及有效性评价 [J]. *广东医学*, 2007, 28(9): 1466-1468.
- [13] 项颖, 秦波, 田小利. DC-CIK 细胞对人肝癌 HepG2 细胞周期, 凋亡的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(23): 2495-2498.
- [14] 钟国成, 张小玉, 孙慧, 等. 抗原致敏 DC 联合 CIK 在原发性肝癌治疗中的应用 [J]. *中国肿瘤临床*, 2009, 36(24): 1404-1408.
- [15] González-Carmona MA, Marten A, Hoffmann P, et al. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells [J]. *Liver Int*, 2006, 26(3): 369-379.
- [16] Shi M, Fu J, Shi F, et al. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Clin Immunol*, 2009, 132(1): 43-54.
- [17] 汤紫荣, 施明, 张冰, 等. 自体 CIKs 治疗对乙肝病毒的抑制作用及机制分析 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(9): 901-903.
- [18] 苏海滨, 李捍卫, 赵洪兰, 等. 自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗 HBV 感染肝硬变患者的临床疗效分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21(1): 64-66.
- [19] Shi M, Fu J, Shi F. Viral suppression correlates with dendritic cell restoration in chronic hepatitis B patients with autologous cytokine-induced killer cell transfusion [J]. *Liver Int*, 2009, 29(3): 466-474.
- [20] 康海燕, 王建彬, 董江龙, 等. 自体 DC、CIK 回输联合干扰素治疗慢性乙肝的临床观察 [J]. *山东医药*, 2011, 51(45): 55-56.
- [21] 童春容, 耿彦彪, 江倩, 等. 自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗白血病合并丙型病毒性肝炎的首次报告 [J]. *北京医科大学学报*, 2000, 32(3): 251-255.