

# CIK 治疗晚期肾癌患者免疫功能变化与血清胆固醇的相关性研究

吴 昂, 朱建伟, 高云芬  
(杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002)

**摘要:** [目的] 观察 CIK 细胞免疫治疗对晚期肾癌患者免疫功能的影响, 分析淋巴细胞亚群与血清胆固醇的相关性。[方法] 选取晚期肾癌患者 36 例, 其中 20 例在常规治疗措施的基础上联合应用 CIK 细胞免疫方法进行, 16 例为常规治疗, 监测两组患者外周血中总 T 细胞 (CD3<sup>+</sup>)、总 B 细胞 (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)、NK 细胞 (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) 辅助诱导 T 细胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)、CD4/CD8 比值等免疫功能指标, 并进行统计学分析。[结果] 联合 CIK 治疗的肾癌患者外周血中抑制/细胞毒性 T 细胞从 24.41%±8.61% 上升到 44.41%±19.29%、辅助/诱导 T 细胞从 41.09%±11.52% 下降为 30.15%±13.96%、CD4/CD8 比值从 1.95±0.95 下降到 0.93±0.67、CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 细胞从 15.31%±10.40% 上升为 45.77%±31.94%、CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 细胞从 10.07%±6.93% 上升到 36.12%±25.89%, 与常规治疗组相比有统计学差异。NK 细胞比率与血清总胆固醇、低密度脂蛋白和载脂蛋白 B 成负相关 ( $r=-0.450, P=0.014; r=-0.469, P=0.010; r=-0.406, P=0.029$ )。[结论] 采用 CIK 细胞免疫治疗能有效提高转移性肾癌患者的细胞免疫功能, 血清胆固醇代谢可能参与调节肿瘤免疫。

**关键词:** 肾肿瘤; CIK 治疗; 淋巴细胞亚群; 胆固醇  
**中图分类号:** R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)11-0942-04  
**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.11.B014

## Effect of CIK Cells Immunotherapy on Immunological Function of Patients with Advanced Renal Carcinoma

WU Ang, ZHU Jian-wei, GAO Yun-fen  
(Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the immune functions of cytokine-induced killer (CIK) cells immunotherapy on patients with advanced renal cell carcinoma. [Methods] The data of 36 patients with advanced renal cell carcinoma were analyzed retrospectively. 16 patients received symptomatic treatment, and 20 patients received CIK treatment and symptomatic treatment. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the patients. Flow cytometer was used to detect the CD3<sup>+</sup> T cell, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> helper T cell, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell and CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer cells. The changes of lymphocyte subtypes were evaluated. [Results] In the combined treatment group, the percentages of cytotoxic T cell increased from (24.41%±8.61%) to (44.41%±19.29%), helper T cell decreased from (41.09%±11.52%) to (30.15%±13.96%), and the proportion of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> decreased from (1.95±0.95) to (0.93±0.67). The percentages of CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cell and CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cell increased from (15.31%±10.40%) to (45.77%±31.94%), (10.07%±6.93%) to (36.12%±25.89%) respectively ( $P<0.05$ ). The proportion of NK cells were negatively correlated with both the serum total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL) levels and apolipoprotein B (apo B) levels ( $r=-0.450, P=0.014; r=-0.469, P=0.010; r=-0.406, P=0.029$ ). [Conclusion] CIK treatment should efficiently improve the immunological status in advanced RCC patients. The cholesterol metabolism may be involved in modulating tumor immune.

**Subject words:** renal cell neoplasms; cytokine-induced killer therapy; lymphocyte subtype; cholesterol

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 简称肾癌, 是最常见的肾脏实质性恶性肿瘤, 约占肾脏肿瘤的

96%<sup>[1]</sup>。肾癌中以透明细胞癌最为常见, 约占肾癌的 60%~85%。手术切除是肾癌的首选有效方法, 但约 25%~30% 的肾癌患者就诊时肿瘤已发生转移。由于 RCC 对放疗、化疗均不敏感, 所以目前肾癌患者临床治疗方案首选手术、辅助免疫治疗。肾癌的免疫

**通讯作者:** 吴 昂, 主治医师, 学士; 杭州市肿瘤医院内二科, 浙江省杭州市上城区严官巷 34 号 (310002); E-mail: 13064764823@163.com

**收稿日期:** 2016-07-01; **修回日期:** 2016-09-30

治疗主要是树突细胞(DC)和细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)。肾癌生物治疗的免疫反应一部分是通过激发T细胞反应实现的,故而通过诱导或扩大宿主防御功能、提高机体免疫系统对肿瘤的特异杀伤能力已成为肾癌免疫治疗的研究热点<sup>[2]</sup>。

肾癌是泌尿系统最常见的三大恶性肿瘤之一。肾癌对放疗、化疗不敏感,生物免疫治疗有一定疗效。CIK细胞免疫治疗被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案<sup>[3]</sup>。研究表明血脂与恶性肿瘤的发生有密切关系<sup>[4,5]</sup>,而细胞免疫中淋巴细胞的数量可能受血中胆固醇水平的调节<sup>[6]</sup>。本研究观察CIK治疗对患者细胞免疫功能指标的变化,了解其对肾细胞癌患者免疫功能的影响,并分析淋巴细胞亚群与胆固醇的相关性,为深入研究CIK治疗对晚期肾癌患者免疫功能调节机制提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

36例肾细胞癌患者为杭州市肿瘤医院2013年1月至2015年12月住院观察病例,均经病理证实。其中男性22例,女性14例,年龄49~77岁,平均年龄64岁;病理类型:透明细胞癌22例,乳头状肾细胞癌14例。36患者中20例在常规治疗措施的基础上联合应用CIK细胞免疫方法进行治疗,16例为常规治疗。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 仪器与试剂

FACS流式细胞仪购于美国贝克曼公司。CD3、CD4、CD8、CD19、CD56、CD25、HLA-DR抗体购于美国贝克曼公司,淋巴细胞分离液为TBD公司产品。

#### 1.2.2 淋巴细胞亚群检测

静脉采集患者外周抗凝全血2ml,签署知情同意书,外周血用等量PBS液稀释。取100 $\mu$ l抗凝全血加20 $\mu$ l荧光标记单克隆抗体混匀,室温避光放置20~30min,加红细胞裂解液10min,PBS洗涤,离心去除上清液2次,加500 $\mu$ l PBS悬浮后上流式细胞仪检测。分别计数10 000个淋巴细胞,各标本以同型抗体作自身阴性对照。

#### 1.2.3 血脂测定

患者与淋巴细胞亚群测定同日空腹采血,并离心收集血清,全自动生化分析仪测定总胆固醇、甘油

三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、载脂蛋白A、载脂蛋白B和载脂蛋白E的水平。

### 1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS12.0统计软件,对常规治疗组和CIK联合治疗组患者淋巴细胞亚群的变化采用独立样本 $t$ 检验,相关性分析采用Pearson检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 联合CIK治疗对患者外周血淋巴细胞亚群的影响

与常规治疗组相比,联合CIK治疗的肾癌患者外周血中总B细胞(CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)、总T细胞(CD3<sup>+</sup>)、抑制/细胞毒性T细胞、NK细胞以及CD3<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>比率上升,辅助/诱导T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞、CD4/CD8比值下降。其中,联合CIK治疗的肾癌患者外周血中抑制/细胞毒性T细胞从24.41% $\pm$ 8.61%上升到44.41% $\pm$ 19.29%、辅助/诱导T细胞从41.09% $\pm$ 11.52%下降为30.15% $\pm$ 13.96%、CD4/CD8比值从1.95 $\pm$ 0.95下降到0.93 $\pm$ 0.67、CD3<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>细胞从15.31% $\pm$ 10.40%上升为45.77% $\pm$ 31.94%、CD8<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>细胞10.07% $\pm$ 6.93%上升到36.12% $\pm$ 25.89%,与常规治疗组比较,有统计学差异( $P<0.05$ )(Table 1)。

### 2.2 联合CIK治疗对患者血脂水平的影响

与常规治疗的肾癌患者相比,联合CIK治疗患者血清总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白以及载脂蛋白A、B、E变化不明显,仅甘油三酯升高,但统计学分析无显著性差异( $P>0.05$ )(Table 2)。

### 2.3 血脂水平与淋巴细胞亚群中抑制/细胞毒性T细胞和NK细胞的相关性

晚期肾癌患者血清甘油三酯与抑制/细胞毒性T细胞比率成正相关( $r=0.535, P=0.002$ ),高密度脂蛋白与低密度脂蛋白与抑制/细胞毒性T细胞比率成负相关( $r=-0.431, P=0.015; r=-0.391, P=0.030$ )。

NK细胞比率与血清总胆固醇、低密度脂蛋白和载脂蛋白B成负相关( $r=-0.450, P=0.014; r=-0.469, P=0.010; r=-0.406, P=0.029$ )(Table 3)。

## 3 讨论

肾癌早期临床表现具有隐蔽性、多变性和非特

**Table 1 Analysis of lymphocyte subset proportion in CIK immunotherapy and common therapy patients**

Parameters	Control (n=16)	CIK immunotherapy (n=20)	P value
Total B cells(CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> )	7.96±5.00	8.22±3.33	0.862
Total T cells(CD3 <sup>+</sup> )	69.45±10.37	77.54±14.06	0.063
Inhibition/cytotoxic T cells	24.41±8.61	44.41±19.29	0.001
Helper/inducer T cells	41.09±11.52	30.15±13.96	0.018
CD4/CD8 ratio	1.95±0.95	0.93±0.67	0.002
NK cells	19.45±8.26	23.69±14.08	0.301
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	8.15±3.84	5.18±5.02	0.059
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	15.31±10.40	45.77±31.94	0.001
CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	10.07±6.93	36.12±25.89	0.001

**Table 2 Serum cholesterol differences between CIK immunotherapy and common therapy patients**

Parameters	Control (n=16)	CIK immunotherapy (n=20)	P value
TC	4.69±1.83	4.67±1.44	0.966
TG	2.34±1.34	4.02±4.35	0.148
HDL	1.12±0.39	0.97±0.31	0.241
LDL	2.77±1.41	2.36±0.99	0.342
Apo A	1.25±0.39	1.18±0.36	0.617
Apo B	1.00±0.40	0.93±0.38	0.659
Apo E	65.17±25.91	70.06±29.06	0.661

**Table 3 Correlations between cytotoxic T lymphocyte, NK lymphocyte subsets and serum cholesterol in advanced RCC patients**

Parameters	Inhibition/cytotoxic T cells	P value	NK cells	P value
TC	-0.014	0.940	-0.450	0.014
TG	0.535	0.002	-0.139	0.472
HDL	-0.431	0.015	-0.208	0.279
LDL	-0.391	0.030	-0.469	0.010
Apo A	-0.291	0.112	-0.233	0.224
Apo B	-0.354	0.051	-0.406	0.029
Apo E	-0.020	0.927	-0.217	0.319

异性,出现典型的临床症状时往往已有广泛进展,甚至有远处转移。肾癌本身对放、化疗不敏感,但它是一种免疫原性极强的肿瘤,免疫治疗成为肾癌患者主要的辅助治疗手段<sup>[7]</sup>。通过纠正肿瘤患者的免疫缺陷,激活特异性抗肿瘤免疫反应,达到消灭肿瘤细胞或抑制肿瘤细胞生长的目的。

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)是将人外周血单个核细胞(PBMC)在体外经多种细胞因子作用后培养获得的一群异质细胞,它同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子,兼具有 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特点,是一种具有增殖速度快、杀瘤活性

高、杀瘤谱广等特点的效应细胞。CIK 能分泌多种细胞因子(如 IL-4、IFN- $\gamma$ ),且具有比 LAK 细胞更强的杀伤活性。CIK 细胞是一种高效、广谱杀瘤活性的非 MHC 限制性免疫效应细胞,其抗肿瘤作用的主要机制包括杀伤肿瘤细胞及促进 T 淋巴细胞增殖活化等。外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>等是反应细胞免疫功能的重要指标,晚期肿瘤患者均存在不同程度的免疫缺陷,检测淋巴细胞亚群变化可以评估疾病的进展情况和预后<sup>[8]</sup>。本实验结果表明联合 CIK 治疗的晚期肾癌患者外周血淋巴细胞亚群中的抑制/细胞毒性 T 细胞、辅助/诱导 T 细胞、NK 细胞等均高于常规治疗组,且淋巴细胞亚群抑制/细胞毒性 T 细胞和辅助/诱导 T 细胞的比率具有统计学差异。该结果提示晚期肾癌患者在经过 CIK 免疫治疗后,原先的免疫抑制状态得到改善,提高机体抗肿瘤免疫效应。相关文献研究发现肾癌患者经免疫治疗后 3 年生存率以及无疾病进展时间均比对照组延长<sup>[9-11]</sup>。

肿瘤患者的抗肿瘤免疫主要是以 T 淋巴细胞介导的特异性细胞免疫为主,CD4<sup>+</sup>为辅助性 T 细胞,能促进效应细胞抗肿瘤作用,CD8<sup>+</sup>为抑制性 T 细胞,抑制机体免疫应答,在正常情况下,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值处于相对平衡状态。本研究结果虽提示与常规治疗组相比,CIK 治疗组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值偏低,与其他研究结果不一致,我们推测这可能与本研究入选病例均为晚期肾癌患者以及样本量偏小有关。肿瘤患者机体处于长期免疫功能紊乱状态,给予 CIK 治疗可改善患者免疫失调状态,但不能完全纠正到正常人水平。进一步分析患者总 T 细胞及抑制/细胞毒性 T 细胞和辅助/诱导 T 细胞在淋巴细胞中所占比重,我们发现机体总体 T 细胞及抑制/细胞毒性 T 细胞和辅助/诱导 T 细胞均处于高水平,提示在晚期肾癌患者中进行 CIK 免疫治疗改变淋巴细胞亚群各个比例,有助于机体抗肿瘤免疫效应的发挥<sup>[12]</sup>。有研究发现,在肿瘤患者及肿瘤动物模型中 Treg 细胞比例的升高与肿瘤的发生、发展密切相关,Treg 可负性调节机体抗肿瘤免疫反应,引起荷

瘤机体 T 淋巴细胞功能障碍,有利于肿瘤的生长和转移<sup>[13]</sup>。本研究结果发现联合 CIK 治疗可降低 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞比例( $P=0.059$ ),与其他文献报道结果一致<sup>[14]</sup>。CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>分别表示淋巴细胞亚群中活化的 T 淋巴细胞及活化的抑制性 T 淋巴细胞所占的比例。本研究发现 CIK 治疗还可改善晚期肾癌患者的这两项指标,将原来处于静止状态的 T 淋巴细胞活化,提高机体抗肿瘤免疫效应。

胆固醇和高密度脂蛋白水平异常与肾癌的发病有着密切的关系,脂代谢紊乱可能是肾癌的危险因素<sup>[5,15]</sup>。本研究比较常规治疗的肾癌患者与 CIK 治疗患者血脂水平虽然并无统计学差别,但数据参照《中国成人血脂异常防治指南》<sup>[16]</sup>可以发现,常规治疗组和联合 CIK 治疗组患者血脂水平均存在不同程度高密度脂蛋白水平降低、低密度脂蛋白水平升高,与其他研究结果一致<sup>[4]</sup>。肿瘤患者外周血中胆固醇水平与淋巴细胞亚群及机体免疫功能的研究目前鲜有报道,不过在最近中国科学院李伯良等发表在 *Nature* 上一篇文章发现在小鼠中抑制胆固醇酯化酶 ACAT1,增加 CD8<sup>+</sup> T 细胞膜的胆固醇水平,从而促进 T 细胞信号转导和杀伤过程<sup>[17]</sup>。本研究初步分析晚期肾癌患者血脂水平与淋巴细胞亚群中抑制/细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的相关性,结果发现 NK 细胞比率与血清总胆固醇、低密度脂蛋白和载脂蛋白负相关,提示肿瘤负荷下患者机体免疫调节与胆固醇代谢有关,但由于本研究缺乏对肿瘤微环境中的胆固醇代谢进行深入研究,因此仅推测胆固醇代谢可能参与 CIK 治疗的免疫调节,但具体机制仍需进一步研究。

由于本研究样本量偏小,因此实验结果可能存在一定的局限性,还需要进一步扩充病例数,从而更加准确地分析 CIK 联合治疗对晚期肾癌患者免疫功能的影响。总之,CIK 联合治疗可在一定程度上增强机体抗肿瘤免疫作用,控制肿瘤的生长、转移,提高肾癌患者生存质量及生存率。

## 参考文献:

- [1] Bai T,Wang L,Wang D,et al. Clinicopathological epidemiological characteristics and change tendencies of renal cell carcinoma in shanxi province of China from 2005 to 2014[J]. PLoS One,2015,10(12):e0144246.
- [2] Coppin C,Porzolt F,Autenrieth M,et al. WITHDRAWN: immunotherapy for advanced renal cell cancer[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews,2015,12:CD001425.
- [3] Jakel CE,Hauser S,Rogenhofer S,et al. Clinical studies

applying cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma[J]. Clin Develop Immunol,2012,2012:473245.

- [4] Zhang GM,Zhu Y,Luo L,et al. Prevalence of dyslipidaemia in patients with renal cell carcinoma:a case-control study in China[J]. BJU Int,2014,113(5b):E75-E81.
- [5] Zhang T,Ouyang XP,He PP,et al. The relationship between renal cell carcinoma and plasma lipoprotein [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine,2013,12(23):1916-1918.[张涛,欧阳新平,何平平,等. 肾癌与血浆脂代谢指标水平相关性分析 [J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(23):1916-1918.]
- [6] Zou JQ,Li WJ,Chang GM,et al. Correlations between the proportions and the raft GM1 levels of lymphocyte subsets and serum Cholesterol levels in the elderly[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis,2015,23(1):49-53. [邹家琦,李文娟,常光明,等. 老年人淋巴细胞亚群和脂筏 GM1 与胆固醇水平的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志,2015,23(1):49-53.]
- [7] Kim JS,Chung IS,Lim SH,et al. Preclinical and clinical studies on cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma [J]. Arch Pharm Res,2014,37(5):559-566.
- [8] Lan XP,Chen YG,Wang Z,et al. Immunotherapy of DC-CIK cells enhances the efficacy of chemotherapy for solid cancer;a meta-analysis of randomized controlled trials in Chinese patients [J]. J Zhejiang Univ Sci B,2015,16(9):743-756.
- [9] Wang ZX,Li JL,Cao JX,et al. Cytokine-induced killer cells in the treatment of patients with renal cell carcinoma:a pooled meta-analysis[J]. Immunotherapy,2014,6(6):787-795.
- [10] Wang H,Feng F,Zhu M,et al. Therapeutic efficacy of dendritic cells pulsed by autologous tumor cell lysate in combination with CIK cells on advanced renal cell carcinoma[J]. Chin J Cell Mol Immunol,2015,31(1):67-71.
- [11] Zhao X,Zhang Z,Li H,et al. Cytokine induced killer cell-based immunotherapies in patients with different stages of renal cell carcinoma[J]. Cancer Lett,2015,362(2):192-198.
- [12] Cui HQ,Zhao JF,Li BD,et al. Effect of CIK cells immunotherapy on immunological function of patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. China Modern Doctor,2014,52(29):132-136.[崔洪泉,赵俊峰,李保东,等. CIK 细胞免疫治疗对转移性肾细胞癌患者免疫功能的影响 [J]. 中国现代医生,2014,52(29):132-136.]
- [13] Chellappa S,Lieske NV,Hagness M,et al. Human regulatory T cells control TCR signaling and susceptibility to suppression in CD4<sup>+</sup> T cells[J]. J Leukoc Biol,2015,100(1):5-16.
- [14] Wang SN,Gao HY,Pan X,et al. Impact of DC-CIK treatment on lymphocyte subsets of patients with renal cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy,2012,19(3):309-312.[王赛男,高海燕,潘欣,等. DC-CIK 治疗对肾癌患者淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2012,19(3):309-312.]
- [15] Haggstrom C,Rapp K,Stocks T,et al. Metabolic factors associated with risk of renal cell carcinoma[J]. PLoS One,2013,8(2):e57475.
- [16] Wu YF,Zhao D,Zhou BF,et al. Cut offs and risk stratification of dylipidemia in Chinese adults [J]. Chinese Journal of Cardiology,2007,35(5):428-433. [武阳丰,赵冬,周北凡,等. 中国成人血脂异常诊断和危险分层方案的研究[J]. 中华心血管病杂志,2007,35(5):428-433.]
- [17] Yang W,Bai Y,Xiong Y,et al. Potentiating the antitumour response of CD8<sup>+</sup> T cells by modulating cholesterol metabolism[J]. Nature,2016,531(7596):651-655.