

CTX、G-CSF 动员造血干细胞过程中NK 细胞检测

宫立众, 张茂宏, 徐从高

摘要: 目的 探讨环磷酰胺(CTX)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员癌症患者造血干细胞过程中NK 细胞数量和活性的变化。方法 21 例诊断明确的癌症患者, 经CTX $4.0\text{g}/\text{m}^2$ 和G-CSF (惠尔血) $150\mu\text{g}/\text{d}$ 动员。动员前(前期)、WBC 降至最低点时(极期)、WBC 开始恢复后 3 天(恢复早期)、WBC 开始恢复后 6 天(恢复期)用流式细胞仪计数 CD_{34}^+ 细胞和NK 细胞, 用乳酸脱氢酶释放法测量NK 细胞活性。结果 动员过程中,NK 细胞极期显著低于前期, 恢复期则显著高于前期, $P < 0.01$; 其变化与WBC、MNC、血小板(BPC)、 CD_{34}^+ 细胞呈显著正相关, $P < 0.05$ 。NK 细胞活性无显著差别, $P > 0.05$ 。结论 动员过程中NK 细胞数量增加, 活性无改变。

关键词: 环磷酰胺; 重组人粒细胞集落刺激因子; 外周血造血干细胞; 自然杀伤细胞

中图分类号: R 730.23; R 730.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2001)05-0369-03

The Changes of Number and Activity of Natural Killer Cells during Mobilization by Cyclophosphamide and G-CSF

GONG Lir-zhong, ZHANG Mao-hong, XU Cong-gao

Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: **Objective** To study the changes of number and activity of natural killer (NK) cells during the cancer patients mobilization by cyclophosphamide (CY) and recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). **Methods** Peripheral blood CD_{34}^+ cells and NK cells ($\text{CD}_{3}^{\text{+}}\text{CD}_{16}^{\text{+}}\text{CD}_{56}^{\text{+}}$) were counted using flow cytometry on the day before mobilization (baseline), the day of WBC nadir (nadir), 3 days after the nadir (early recovery phase), six days after the nadir (recovery phase) in 21 cancer patients mobilized with $\text{CTX } 4.0\text{g}/\text{m}^2$, and $150\mu\text{g}/\text{d}$ G-CSF (Filgrastim). NK cell activities were tested by LDH releasing method. **Results** Nadir NK cell numbers were significantly less and recovery phase NK cell numbers were significantly higher than that of baseline, $P < 0.01$. NK cell number has had positive relationship with WBC, MNC, platelet count and CD_{34}^+ cell count during the mobilization, $P < 0.05$. NK cell activities had no significantly difference. **Conclusion** NK cell number increases during mobilization, while NK activity remains unchanged.

Key words: Cyclophosphamide; Recombinant human granulocyte colony stimulating factor; Peripheral blood stem cell; Natural killer cell

NK 细胞是细胞免疫的非特异成分, 处于机体抗肿瘤的第一道防线。经白细胞介素 2 (IL-2) 活化的NK 细胞抗瘤谱扩大, 细胞毒性增强, 对大部分实体瘤和白血病细胞有杀伤作用, 可以用来净化自体骨髓, 清除微小残留病变^[1]。活化的NK 细胞还可以促进骨髓的植入而不增加 GVHD 的发生^[2,3]。为了解在动员过程中,NK 细胞数量和活性有什么样的变化规律, 我们观察了CTX、G-CSF 动员造血干细

胞过程中,NK 细胞数量和活性的动态变化, 以期为开发利用NK 细胞打下基础。

1 资料和方法

1.1 病例 21 例诊断明确的癌症患者, 包括 11 例非霍奇金淋巴瘤, 1 例霍奇金病, 3 例乳腺癌, 2 例急性非淋巴细胞白血病完全缓解期病人, 2 例急性淋巴细胞白血病完全缓解期病人, 2 例慢性髓性白血病慢性期病人。男 15 例, 女 6 例, 平均年龄 30.1 岁 (19~ 62 岁)。

1.2 动员方案 CTX $2.0\text{g}/\text{m}^2 +$ 生理盐水 500ml , 静脉滴注, 连续 2 d。同时水化、碱化, 应用恩丹西酮、别嘌醇、美司那。在WBC 计数达最低点时或

收稿日期: 2000-08-14; 修回日期: 2001-02-21

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院血液科

WBC < 1.0 × 10⁹/L 时, 开始皮下注射 rhG-CSF (Filgrastim, 日本麒麟公司) 150μg/d, 直至完成采集外周血干细胞。动员过程中每天上午血细胞计数。动员前(前期)、WBC 降至最低点时(极期)、WBC 降至最低点后 3d(恢复早期)、WBC 开始恢复后 6d(恢复期)计数 CD₃₄⁺ 细胞。

1.3 血细胞计数方法 手指外周血计数用瑞典产 MEDONICA 610 血细胞自动分析仪, 全套试剂由原公司提供。外周血涂片, 瑞氏染色后, 油镜下计数 200~ 1000 个有核细胞。

1.4 CD₃₄⁺ 细胞检测 晨起取空腹静脉血, 肝素抗凝, 加入 PE 标记的抗 CD₃₄ 单克隆抗体 (CD₃₄-PE, PHARMINGEN 公司产品), 混匀, 避光放置 30 分钟。加入溶血素 (FACS lysing solution, BECTON-DICKINSON 公司) 破坏红细胞, 洗涤后, 上流式细

胞仪 (FACS Vantage, BECTON-DICKINSON 公司产品) 测试 10⁵ 细胞, 计算 CD₃₄⁺ 细胞所占比例。

1.5 NK 细胞检测 与 CD₃₄⁺ 细胞检测方法同, 标记单抗为 CD₃⁻ CD₁₆⁺ CD₅₆⁺ (CD₃-FITC, CD₁₆CD₅₆-PE, BECTON-DICKINSON 公司产品)。

1.6 NK 细胞活性测定方法 按王甫厚的方法进行^[4]。

1.7 统计学方法 结果以均数 ± 标准差表示, 采用 *t* 检验方法和相关分析。

2 结果

2.1 动员过程中 NK 细胞计数动态变化 极期时, NK 细胞与动员前相比, 显著减少, *P* < 0.01; 恢复早期, 血中 NK 细胞数量恢复至动员前水平, *P* > 0.05。恢复期 NK 细胞明显增加, *P* < 0.01。详细结果见表 1。

表 1 动员过程中 NK、CD₃₄⁺、MNC、WBC、BPC 的变化

指标	前期	极期	恢复早期	恢复期
NK 细胞 (/ul)	206.77 ± 93.85	72.35 ± 34.22**	189.25 ± 102.05	471.03 ± 231.96*
(范围)	(59.73~ 361.25)	(30.00~ 183.75)	(72.00~ 244.91)	(112.0~ 768.11)
CD ₃₄ ⁺ 细胞 (/ul)	13.08 ± 9.19	3.05 ± 2.48**	24.24 ± 20.94**	114.56 ± 188.36*
(范围)	(3.12~ 48.64)	(0.1~ 9.0)	(5.30~ 84.50)	(12.06~ 632.22)
WBC (10 ⁹ /L)	5.31 ± 1.50	1.13 ± 0.54**	4.75 ± 1.87	21.31 ± 10.55**
(范围)	(2.8~ 7.8)	(0.4~ 1.8)	(2.0~ 7.8)	(9.5~ 46.4)
MNC (10 ⁹ /L)	1.65 ± 0.57	0.63 ± 0.34**	1.48 ± 0.62	3.18 ± 2.41*
(范围)	(0.7~ 1.9)	(0.2~ 1.3)	(0.8~ 2.7)	(1.0~ 12.1)
BPC (10 ⁹ /L)	189.67 ± 81.00	79.19 ± 63.17**	129.29 ± 61.66**	188.62 ± 75.60*
(范围)	(85~ 432)	(21~ 285)	(63~ 257)	(89~ 330)

* 与前期相比, 差别显著, *P* < 0.05 ** 与前期相比, 差别显著, *P* < 0.01

2.2 动员过程中 MNC 的变化及与 NK 细胞变化的关系 动员过程中 MNC 的变化见表 1; MNC 与 NK 细胞呈显著正相关, *r* = 0.818, *P* < 0.01。

2.3 动员过程中 WBC 的动态变化及与 NK 细胞变化的关系 动员过程中 WBC 计数变化详见表 1; WBC 与 NK 细胞变化呈显著正相关, *r* = 0.866, *P* < 0.01。

2.4 动员过程中血小板 (BPC) 的变化及与 NK 细胞变化的关系 动员过程中 BPC 的变化见表 1; 血小板变化与 NK 细胞呈显著正相关, *r* = 0.350, *P* < 0.05。

2.5 动员过程中 CD₃₄⁺ 细胞动态变化与 NK 细胞动态变化的关系 动员过程中, CD₃₄⁺ 细胞变化见表 1。CD₃₄⁺ 细胞与 NK 细胞呈显著正相关, *r* = 0.624, *P* < 0.01。

2.6 动员过程中 NK 细胞活性 动员过程中 NK 细胞活性各期差别不显著, *P* > 0.05。

3 讨论

化疗后骨髓抑制极期, NK 细胞计数明显降低; 恢复早期, 血中 NK 细胞亦恢复至动员前水平; 恢复

期, 血中 NK 细胞数量显著升高, 是基础水平的 2.28 倍。这说明, CTX、G-CSF 动员造血干细胞过程中, NK 细胞亦可被“动员”入血。这与 Silva 报道 CTX、G-CSF 能增加血中 NK 细胞数量一致^[5], GM-CSF 动员癌症患者, 亦可见血中 NK 细胞的数量增加^[6,7], G-CSF 动员正常时, 血中 NK 细胞可增加 1~ 1.5 倍^[8,9]。可见, 在干细胞动员过程中, NK 细胞有一定程度增加。

我们的实验证实, 动员过程中, NK 细胞变化与 WBC、MNC、BPC 呈显著正相关, 这说明, 血中 NK 细胞数量随着骨髓造血功能恢复而增加, WBC、MNC 均能很好预测 NK 细胞的变化, BPC 则稍差。所以, 欲采集 NK 细胞, 合适时机为骨髓造血功能开始恢复, WBC、MNC 恢复至动员前水平。

在动员过程中, NK 细胞的变化与 CD₃₄⁺ 细胞呈显著正相关, 到恢复期时, NK 细胞、CD₃₄⁺ 细胞同时达高峰^[5]。这说明, 在动员过程中, NK 细胞、CD₃₄⁺ 细胞有相似的变化规律, 可以互相作为预测指标, 即 NK 细胞可以预测 CD₃₄⁺ 细胞高峰, CD₃₄⁺ 细胞亦可作为预测 NK 细胞的指标。其他作者也有

类似的经验, GM-CSF 动员癌症患者, CD₃₄⁺ 细胞与 NK 细胞同时出现高峰或相差一天出现高峰^[6,7]。G-CSF 动员正常人, 两者同时达高峰^[8]。这就预示, 在采集外周血造血干细胞的同时, 也采集了大量的 NK 细胞, 收获了较多的 NK 细胞, 可以考虑用于肿瘤的生物治疗。

参考文献:

[1] Cervantes F, Pierson BA, McGlave PB, et al Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long term culture [J]. Blood, 1996, 87(6): 2476-2485

[2] Murphy WJ, Bennett M, Kumar V, et al Donor type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation[J]. J Immunol, 1992, 148(9): 2953-2960

[3] Zeis M, Uharek L, Glass B, et al Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice [J]. Transplantation, 1995, 59(12): 1734-1736

[4] 王甫厚, 陈绍先, 郭彩云, 等 LDH 释放法测 NK 细胞毒的方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 1990, 6(2): 115-117.

[5] Silva MR, Parreira A, A scensao JL. Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: conditions for in vitro expansion [J]. Exp Hematol, 1995, 23(14): 1676-1681.

[6] Verbiik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ, et al Functional and phenotypic characterization of human peripheral blood stem cell harvest: a comparative analysis of cells from consecutive collections [J]. Blood, 1995, 85(7): 1964-1970

[7] Mills KC, Gross TG, Varney ML, et al Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood [J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 18(1): 53-61.

[8] Sica S, Rutella S, Di Marzio A, et al RhG-CSF in healthy donors: mobilization of peripheral hemopoietic progenitors and effect on peripheral blood leukocytes [J]. J Hematother, 1996, 5(4): 391-397.

[9] Majolino I, Buscemi F, Scime R, et al Treatment of normal donor with rhG-CSF 16 microgram s/kg for mobilization of peripheral blood stem cells and their apheretic collection for allogeneic transplantation [J]. Haematologica, 1995, 80(3): 219-226

(熊 静校对)

异环磷酰胺为主联合化疗在晚期肺癌中的应用

殷 娟, 谢正强, 李 勇, 权瑞泉, 李宏章

关键词: 化疗; 肺癌; 观察

中图分类号: R 734.2 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578(2001)05-0371-01

为探讨异环磷酰胺 (IFO) 治疗晚期肺癌的疗效, 自 1996 年 12 月~ 2000 年 7 月, 我们以 IFO 为主联合化疗治疗 103 例晚期肺癌, 现报告如下:

1 材料与与方法

1.1 临床资料 103 例肺癌中男性 80 例, 女性 23 例; 年龄 18~ 74 岁, 平均年龄 56 岁; 临床分期 IIIa 30 例, IIIb 期 25 例, IV 期 48 例; 初治 59 例, 复治 44 例。所有病例均有病理诊断及影像学可测量指标。

1.2 治疗方法 103 例晚期肺癌分别采用以 IFO 为主的联合化疗方案 IAP (IFO + ADM + DDP), IEP (IFO + VP-16 + DDP) 和 IVP (IFO + VDS + DDP) 治疗。三种方案中 IFO 1.5/m² iv drip d₁₋₄, 用 IFO 后 0、4 和 8h 各静注尿路保护剂美斯钠 (Mesna) 400mg 并适当水化。化疗前给予恩丹西酮 8mg 静注, 每 21~ 28

天为一化疗周期; 白细胞抵于 3.0 × 10⁹/L 时给予粒细胞刺激因子 (G-CSF) 注射。完成两疗程化疗评定疗效。

1.3 疗效判断 按 WHO 制定的疗效标准分 CR、PR、NC 和 PD。毒性反应按 WHO 指定标准分 0、I、II、III、IV 度。

2 结果

2.1 近期疗效 IAP 组 24 例: CR 2 例, PR 13 例; IEP 组 35 例: CR 3 例, PR 19 例; IVP 组 44 例: CR 5 例, PR 24 例; IAP、IEP、IVP 三组有效率依次为 62.5%, 62.9% 和 65.9%, 其中小细胞肺癌 (SCLC) 的有效率分别为 83.3%, 80.0% 和 81.8%; 非小细胞肺癌 (NSCLC) 的有效率分别为 55.65%, 56.0% 和 60.6%。

2.2 毒副反应 恶心、呕吐发生率为 37%, 骨髓抑制严重, 白细胞减少达 100%, III 度以上白细胞减少达 52.3%, 白细胞下降最低点为化疗后 d₁₀₋₁₄; III 度以上血小板减少达 29.5%。脱发达 70%。少数病人有一

过性肝功能受损, 无严重心肾功能损害及出血性膀胱炎发生。

3 讨论

晚期肺癌的治疗, 以联合化疗为主。IFO 为第二代磷酰胺类抗肿瘤药物, 水溶性高于环磷酰胺 (CTX), 其活性较 CTX 的活化型-羟基环磷酰胺强。由于其代谢产物羟基异环磷酰胺和丙烯醛易导致明显泌尿系毒性反应, 临床应用曾一度受限。而 Mesna 可与 IFO 的代谢产物形成稳定无毒的产物。近几年, Mesna 的出现, 使 IFO 已广泛用于临床, IFO 为主的联合化疗治疗晚期肺癌, 取得了明显的疗效。国外进行了广泛研究, IFO 单药对 NSCLC 的有效率达 12%~ 42%, 联合化疗治疗晚期 NSCLC 疗效在 24%~ 64% 之间; 据报道, 含 IFO 的联合化疗治疗 SCLC 有效率可达 88% 左右。本组病例采用 IFO 为主的联合化疗方案 IAP、IEP 和 IVP 治疗, 均显示出较好疗效, 与资料报道相符。毒副反应主要是骨髓抑制, 但合并应用 G-CSF 后病人多能耐受。我们认为 IFO 为主的联合化疗方案用于治疗晚期肺癌, 无论是 NSCLC, 还是 SCLC 近期疗效均较好, 尤其对复治的患者显示出较好疗效。说明 IFO 是一种抗癌谱广、高效、稳定, 不易耐药的药物, 可作为晚期肺癌治疗首选的磷酰胺类抗肿瘤药。

(刘红武校对)

收稿日期: 2000-12-07; 修回日期: 2001-06-05

作者单位: 442008 十堰市, 东风汽车公司总医院肿瘤科

70%。少数病人有一

