

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 0g/m² 和 G-CSF (惠尔血) 150μg/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 CD₃₄⁺ 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)、CD₃₄⁺ 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 CD₃₄⁺ cells and NK cells (CD₃⁺CD₁₆⁺CD₅₆⁺) 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 CTX 4 0g/m², and 150ug/d G-CSF (Filgrastin). 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 CD₃₄⁺ 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 0g/m²+ 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