

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00897

• 短篇论著 •

自体树突状细胞疫苗联合细胞因子诱导的杀伤细胞治疗胆系肿瘤的 临床疗效观察

寇晓霞, 杨喜晶, 黄耀, 袁振刚, 钱其军*

第二军医大学东方肝胆外科医院生物治疗科, 上海 200438

[摘要] **目的** 观察自体树突状细胞(DC)疫苗联合细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK细胞)治疗胆系肿瘤的临床疗效。**方法** 采集患者外周血单个核细胞,采用多种肿瘤抗原刺激后进行扩增和培养,收获成熟DC制成疫苗进行皮内注射,同时联合自体CIK细胞静脉回输,观察85例胆系肿瘤患者治疗前后的临床疗效、免疫功能、不良反应及生存时间。**结果** 85例胆系肿瘤患者经自体DC-CIK细胞治疗后,临床症状较前明显改善($P<0.05$);临床疗效显著,完全缓解2例(2.3%)、部分缓解14例(16.5%)、疾病稳定54例(63.5%)及疾病进展15例(17.6%);免疫功能提高,治疗后淋巴细胞亚群中 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比值升高,而调节性T细胞降低($P<0.05$)。至随访结束,58例患者死亡,2例失访,25例存活,中位生存期为16.5个月(95%CI:12.1~20.9个月)。**结论** 自体DC-CIK细胞治疗是胆系肿瘤患者一种安全有效的治疗方法,不良反应少,但相关结论仍有待进一步大样本随机对照研究证实。

[关键词] 树突状细胞疫苗;细胞因子诱导的杀伤细胞;胆道肿瘤;药物治疗;过继性细胞免疫治疗

[中图分类号] R 735.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)08-0897-04

Autologous dendritic cells vaccine combined with cytokine-induced killer cells in treatment of biliary tract cancer: a clinical observation of efficacy

KOU Xiao-xia, YANG Xi-jing, HUANG Yao, YUAN Zhen-gang, QIAN Qi-jun*

Department of Biotherapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To observe the clinical efficacy of autologous dendritic cells (DCs) vaccine combined with cytokine-induced killer (CIK) cells for treatment of patients with biliary tract cancer. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from the patients with biliary tract cancer and were stimulated with multiple tumor-associated antigens (TAA) for amplification and culture. Mature DCs were harvested and made into vaccine for intradermal administration, and at the same time the patients were given autologous CIK cells via vein transfusion. The clinical efficacy, immune function, side effect, and overall survival of 85 patients with biliary tract cancer were observed before and after treatment. **Results** The clinical symptoms were improved significantly in the 85 patients after autologous DC-CIK therapy ($P<0.05$). The clinical efficacy was remarkable: with 2 cases (2.3%) having complete remission, 14 (16.5%) with partial remission, 54 (63.5%) with stable disease and 15 (17.6%) with progressive disease. The immune function was improved after combined treatment; $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD56^+$ and $CD4^+/CD8^+$ ratio were elevated in the lymphocyte subpopulation, but the regulatory T cells were reduced ($P<0.05$). At the end of the follow-up, 58 patients died, 2 patients were lost in follow-up, and 25 patients survived, with the median overall survival time being 16.5 months (95%CI: 12.1-20.9 months). **Conclusion** Autologous DC-CIK therapy is a safe and effective treatment for patients with biliary tract cancer, with less side effect, but the relevant conclusion still needs to be confirmed by larger sample randomized controlled studies.

[Key words] dendritic cells vaccine; cytokine-induced killer cells; biliary tract neoplasms; drug therapy; adoptive cellular immunotherapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(8): 897-900]

[收稿日期] 2015-01-09 **[接受日期]** 2015-05-19

[基金项目] 第二军医大学青年启动基金课题(2012QN18). Supported by the Start Fund for Youth of Second Military Medical University (2012QN18).

[作者简介] 寇晓霞, 硕士生, 住院医师. E-mail: yanyisunnyco@hotmail.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875371, E-mail: 13311850698@163.com

胆道系统肿瘤简称胆系肿瘤,是起源于胆囊和胆管上皮的恶性肿瘤,包括肝内胆管癌、肝外胆管癌、胆囊癌以及壶腹癌^[1]。手术切除仍是目前最主要的治疗方法,但手术切除难度较大,且术后复发、转移率高,对放疗不敏感,预后较差^[2-3]。因此,探讨新的有效的胆系肿瘤治疗方法显得十分必要。肿瘤免疫治疗近年来受到了广泛研究和关注,其中树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前所知在体内功能最强的抗原递呈细胞,能够诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫反应;细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cells, CIK 细胞)是由 IFN- γ 、IL-2 及 CD3 单抗诱导的一种广谱抗肿瘤免疫细胞,二者联合,能够更加有效地发挥抗肿瘤作用,是目前过继细胞免疫治疗的首选方法^[4]。本研究采用自体 DC 疫苗联合 CIK 细胞治疗胆系肿瘤患者,初步观察其临床疗效,探讨二者联合治疗胆系肿瘤的可行性。

1 资料和方法

1.1 研究对象 2012年1月至2014年10月第二军医大学东方肝胆外科医院生物治疗科收治的85例符合入选标准的胆系肿瘤患者,其中男46例,女39例,年龄20~75岁,平均(56.0 \pm 10.5)岁。患者中肝内胆管癌41例,肝门部胆管癌12例,肝外胆管癌7例,胆囊癌23例,壶腹癌2例;45例经病理证实,40例经临床资料及影像学诊断。41例为初治的局部晚期患者,32例为术后复发或转移患者,12例为术后辅助治疗。ECOG评分0分8例,1分53例,2分23例,3分1例;根据UICC/AJCC第7版TNM分期:Ⅳ期62例,Ⅲ期17例,Ⅱ期6例。

入选标准:(1)年龄 \geq 18岁,且 \leq 75岁;(2)预期寿命至少为6个月;(3)ECOG评分0~3;(4)主要实验室指标:白细胞 \geq 3.0 \times 10⁹/L、血小板 \geq 60 \times 10⁹/L、血红蛋白 \geq 85 g/L,总胆红素正常范围或 \leq 1.5倍正常值上限,转氨酶正常范围或 \leq 5倍正常值上限,血清肌酐正常范围或 \leq 1.5倍正常值上限。本研究经第二军医大学东方肝胆外科医院伦理委员会批准,所有患者或授权家属均签署DC-CIK治疗知情同意书。

1.2 DC-CIK细胞的制备及治疗方法

1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的采集 治疗周期当天用

FRESENIUS COM. TEC 血细胞分离机(FRESENIUS KABI公司)进行PBMC采集,采用auto MNC程序,P1YA耗材,采集数量约为2 \times 10⁸/L。

1.2.2 DC-CIK的分离及培养 采集的PBMC用不含血清的AIM-V培养液(Gibco)洗涤2次后,稀释至4 \times 10⁶/L。将细胞转移至培养袋中培养2h,收集非贴壁细胞,用于培养CIK细胞,贴壁细胞用于制备DC细胞,向其中加入含有GM-CSF(1000 ng/mL)、IL-4(1000 U/mL)和FLT-3(50 ng/mL)的培养液,每2d更换1/2培养液,补充细胞因子,第6天用包含多种肿瘤抗原(TAA)的腺病毒(血清35型)进行转染,收集DC细胞,培养24h后,向其中加入TNF- α (100 ng/mL)和CD40L(50 ng/mL),然后继续培养2d。非贴壁细胞收集后将密度调整至2 \times 10⁹/mL,然后放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱中,加入IFN- γ (1000 U/mL)培养,每天更换1/2培养液,加入CD3多克隆抗体(50 ng/mL)和IL-2(1000 U/mL)。第9天将经过多抗原刺激的DC加入CIK培养液中,在上述条件下共同培养2d。经细菌、真菌及内毒素检测阴性后分别于第11、15天收集悬浮的、经表型鉴定的成熟DC,溶于1mL生理盐水中,皮内注射于腹股沟淋巴结;分别于第11、13、15天收集CIK细胞,细胞总数 $>$ 2 \times 10¹⁰/L,离心、洗涤后,溶于含0.25%人血白蛋白生理盐水溶液300mL中,静脉滴注,30min回输入患者体内。所有细胞因子均购自Novoprotein公司(上海),所有细胞培养过程均在GMP标准车间内完成。

1.3 观察指标及疗效评价 观察指标包括生活质量、疗效评价、免疫功能、不良反应及生存时间。生活质量评价:对患者临床症状进行问卷调查,然后进行统计和比较。疗效评估:根据WHO制定的实体瘤疗效评估标准进行评估,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)及疾病进展(PD)。免疫功能的评价:采用流式细胞仪检测患者外周血中CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁺CD56⁺及调节性T细胞的变化。生存时间从第1次接受细胞治疗开始计算,每30d1个疗程,2个疗程后复查增强CT进行疗效评估,随访时间至2014年12月。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件,计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时间点的比较采用重复测量方差分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析,计算中位生存时间。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 临床症状改善情况 治疗前及治疗后 2 周分别对患者临床症状进行问卷调查、统计和比较,结果(表 1)表明:与治疗前相比,DC-CIK 治疗后患者临床症状有明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 胆系肿瘤患者免疫治疗后临床症状改善情况

N=85, n			
临床症状	免疫治疗前	免疫治疗后	P 值
失眠	34	11	<0.05
癌性疼痛	6	2	<0.05
乏力	18	5	<0.05
纳差	21	9	<0.05
恶心、呕吐	2	0	<0.05

2.2 疗效评价 大多数患者治疗后为 SD(63.5%, 54/85)及 PR(16.5%, 14/85),个别患者甚至达到 CR(2.3%, 2/85),但也有部分患者为 PD(17.6%,

15/85)。其中 1 例 68 岁的女性患者,诊断为肝内胆管癌伴肝门部等多发淋巴结转移,治疗后不但达到了 PR,且治疗结束后 1 年病灶仍保持稳定(图 1)。

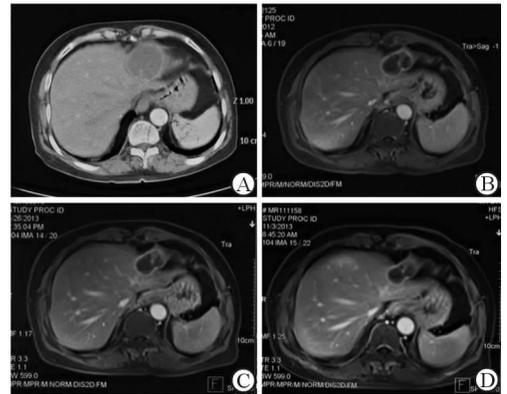


图 1 1 例患者免疫治疗前后影像学资料对比

A:免疫治疗前;B:免疫治疗后即刻;C:免疫治疗后 6 个月;D:免疫治疗后 1 年

2.3 免疫指标变化 结果(表 2)表明:DC-CIK 治疗后,淋巴细胞亚群中 $CD3^+$ 、 $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 、 $CD3^+ CD56^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比值均明显升高,而调节性 T 细胞则明显降低($P < 0.05$)。

表 2 DC-CIK 治疗后外周血淋巴细胞亚群的变化

n=85, $\bar{x} \pm s$						
时间	$CD3^+$ (%)	$CD3^+ CD4^+$ (%)	$CD3^+ CD8^+$ (%)	$CD3^+ CD56^+$ (%)	$CD4^+/CD8^+$	Treg(%)
治疗前	61.89±16.51	33.15±11.84	31.52±12.93	2.56±2.21	1.13±0.84	7.36±5.10
治疗后	67.06±14.89*	36.72±12.83*	34.97±13.54*	5.10±5.43*	1.78±0.76*	4.92±3.84*

* $P < 0.05$ 与治疗前比较

2.4 不良反应 不良反应一般发生于回输后 1~2 h,以发热为主,其中低热($\leq 38.0^\circ\text{C}$)22 例,未经任何处理体温自行恢复正常;中度热($38.0 \sim 39.0^\circ\text{C}$)8 例,其中 3 例未经特殊处理体温自行恢复,另外 5 例使用解热镇痛药后体温降至正常;高热($\geq 39.0^\circ\text{C}$)5 例,持续时间在 2~8 h,行血常规、C 反应蛋白等检测无明显异常改变,使用解热镇痛药后体温降至正常。85 例患者中,有 2 例在细胞治疗 2 h 后出现血压轻度升高($\leq 160/110 \text{ mmHg}$, $1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$),经硝苯地平舌下含化后降至正常,无头晕、恶心、呕吐等伴随症状。有 26 例患者经观察后无任何不良反应。

2.5 总生存期 至随访结束,共有 58 例患者死亡,2 例失访,25 例存活,中位生存期为 16.5 个月(95% CI: 12.1~20.9 个月,图 2)。

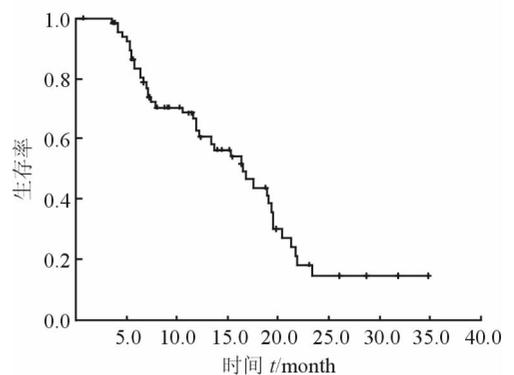


图 2 胆系肿瘤患者 DC-CIK 治疗后生存曲线

3 讨论

胆系肿瘤的发病原因尚不明确,可能与胆道结石有一定关系^[5],发病率逐年增长,目前暂无有效的治疗方法。自 Valle 等^[3]报道吉西他滨联合顺铂一

线化疗取得较好的结果后,该方案已作为一线治疗被广泛应用,但多数晚期患者不能耐受,同时化疗有可能打破肿瘤与机体间的动态免疫平衡,使肿瘤细胞进一步增殖及播散^[6]。随着分子生物学和免疫学的快速发展,肿瘤生物治疗近年来日益受到重视,已成为与手术、放疗及化疗并列的肿瘤第四大治疗模式^[6]。其中过继性细胞免疫治疗以其突出的临床安全性以及能与手术、放疗和化疗有效地结合,显示出良好的临床应用前景^[7]。

DC是目前发现的最有效的抗原递呈细胞,它可以激发T细胞应答,参与主动免疫与被动免疫反应,有效抵制肿瘤细胞的免疫逃逸机制^[8]。CIK是一群经细胞因子激活和培养后获得的异质细胞,其主要效应细胞的表面标志为CD3⁺CD56⁺,对肿瘤细胞的杀伤作用具有高效性和非主要组织相容性复合体(MHC)限制性的特点,是一类杀瘤活性强和抗瘤谱广的新型抗肿瘤效应细胞。CIK扩增速度快,体外制备相对容易,有效成分相对稳定,且同时可增强肿瘤患者的免疫功能^[9]。将DC与CIK共培养后产生的细胞群体比同源CIK细胞具有更强的增殖活性,且两者能相互调节而增加细胞因子释放和增强细胞毒性,提高CIK细胞的杀伤活性,同时也能提高DC的功能^[10]。

本研究结果发现,DC疫苗联合自体CIK细胞回输可明显改善患者生活质量,包括减轻癌痛、乏力、纳差、恶心、呕吐等症状。同时,可延缓肿瘤进展,减慢肿瘤生长速度,即使在停止细胞免疫治疗后,仍可获得持续的作用。本研究中CR的例数不多,考虑可能与入组患者临床分期绝大多数较晚、肿瘤负荷过大有关,但PR、SD例数较多,且中位生存时间为16.5个月,较以往研究^[3]明显延长。研究结果提示,免疫细胞治疗对绝大多数患者可起到延缓及稳定肿瘤生长、延长生存期的作用。本研究中经过治疗的患者T细胞亚群中的效应细胞比例及CD4⁺/CD8⁺比值均较治疗前明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果说明细胞治疗可提高患者免疫功能,同时Treg比例较治疗前降低($P < 0.05$),而Treg细胞介导的是抗肿瘤免疫耐受,促进肿瘤生长,Treg的降低提示对肿瘤的预后有明显改善。细胞治疗的不良反应主要为低热,且症状轻微,大多可自行缓解,说明细胞治疗安全可靠。

综上所述,DC疫苗联合CIK细胞回输在晚期胆系肿瘤的治疗中有很大的潜力,是一种疗效满意、临床安全性好、可接受性强的治疗方法,但仍需大样本的随机对照试验来进一步观察其远期疗效。

[参考文献]

- [1] Walter T, Horgan A M, McNamara M, McKeever L, Min T, Hedley D, et al. Feasibility and benefits of second-line chemotherapy in advanced biliary tract cancer: a large retrospective study[J]. *Eur J Cancer*, 2013,49:329-335.
- [2] Hezel A F, Zhu A X. Systemic therapy for biliary tract cancers[J]. *Oncologist*, 2008,13:415-423.
- [3] Valle J, Wasan H, Palmer D H, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010,362:1273-1281.
- [4] Tan G, Zhang X, Feng H, Luo H, Wang Z. The therapeutic effect of cytokine-induced killer cells on pancreatic cancer enhanced by dendritic cells pulsed with K-ras mutant peptide [J]. *Clin Dev Immunol*, 2011,2011:649359.
- [5] Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States [J]. *Hepatology*, 2001, 33:1353-1357.
- [6] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海:复旦大学出版社, 2011:620-640.
- [7] Hui D, Qiang L, Jian W, Ti Z, Da-Lu K. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2009,41:36-41.
- [8] Zhan H L, Gao X, Pu X Y, Li W, Li Z J, Zhou X F, et al. A randomized controlled trial of postoperative tumor lysate-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells immunotherapy in patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012,125:3771-3777.
- [9] 要跟东,霍红旗,李鹏,刘爱民. 健康人和肝癌患者CIK体外增殖能力及对原代肝癌细胞抗肿瘤作用的比较研究[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011,38:555-558.
- [10] Wang Q J, Wang H, Pan K, Li Y Q, Huang L X, Chen S P, et al. Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29:641-648.