

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.022

树突状细胞免疫治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察

杭晓声¹, 史 央², 李 丽², 项 方², 时宏珍²

Clinical Effect of Vaccination with Autologous Dendritic Cells Against Advanced Non-small Lung Cancer

Hang Xiaosheng¹, Shi Yang², Li Li², Xiang Fang², Shi Hongzhen²

1. Department of Oncology, Wuxi Fourth Hospital Affiliated to Soochow University, Wuxi 214062, China; 2. Naijing Decon Bio-technology Co., LTD

Corresponding Author: Shi Hongzhen, E-mail: shi_hongzhen@deconbio.com

Abstract: Objective Therapeutic outcomes of advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) are not satisfactory, dendritic cells (DCs) vaccine has been developed as a novel strategy against cancer, the aim of this study was to investigate the safety and clinical value of DCs vaccine loaded with heat shock induced apoptotic NSCLC cell lines. **Methods** A two-armed trial, with 38 patients with stage III B-IV NSCLC after standard therapy was performed. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated into adherent cells for induction of DCs loaded with heat shock induced apoptotic NSCLC cell lines. Every week the DCs vaccine was administered intradermally near the inguinal region. The safety and overall survival (OS) were examined. **Results** DCs vaccine was well tolerated and no obviously toxicity was observed. Although the median survival and the one-year-survival rate of the experiment group were higher than the control group, the statistics showed no significance. **Conclusion** DCs vaccine for NSCLC is worthy of further study.

Key words: Dendritic cells; Non-small cell lung cancer; Immunotherapy

摘要: 目的 探讨热休克诱导的细胞株负载树突状细胞 (DC) 治疗晚期非小细胞肺癌的安全性和有效性。 **方法** 38 例均接受过常规治疗的晚期非小细胞肺癌患者分成两组, DC 治疗组 18 例, 对照组 20 例。治疗组患者分离患者外周血单核细胞, 体外诱导 DC, 热休克诱导凋亡的细胞株负载自体 DC, 将 DC 行皮内回输, 观察患者的安全性和有效性, 比较两组的总生存期 (OS)。 **结果** 没有观察到明显的不良反应, DC 免疫治疗安全性高; 治疗组的中位生存期为 9.2 月, 对照组的中位生存期 7.2 月, 但两组比较没有统计学意义。 **结论** 非小细胞肺癌的 DC 免疫治疗值得进一步研究。

关键词: 树突状细胞; 非小细胞肺癌; 免疫治疗

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0205-05

0 引言

肺癌是最常见的恶性肿瘤, 是发病率和死亡率占首位的恶性肿瘤^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌的 75%~80%^[2]。在中国, 肺癌的发病率一直呈上升趋势, 预计到 2025 年, 我国每年肺癌新发病例数将超过 100 万^[3]。NSCLC 有多种类型, 其中以鳞癌、腺癌为主, 晚期患者的 5 年生存率亦大约只有 15%^[4]。

树突状细胞 (dendritic cells, DC) 是迄今为止发

现的体内功能最为强大的抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 是唯一具有激活静息性 T 淋巴细胞 (Naive T) 能力的抗原呈递细胞^[5-6]。有报道表明采用热休克可以使肿瘤细胞高表达热休克蛋白 (heat shock protein, HSP), 通过 DC 表面的 HSP 受体介导的内吞机制可以更高效地吞噬、递呈肿瘤细胞抗原, 激活更强的 CTL 反应^[7]。该研究采用热休克诱导凋亡的负载自体 DC, 对 18 例晚期 NSCLC 患者进行治疗, 对治疗的安全性和有效性进行了评估。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 病例选择 根据中国食品药品监督管理局颁布的《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指

收稿日期: 2011-08-23; 修回日期: 2011-11-16

基金项目: 南京市科技人才资助项目 (20060288)

作者单位: 1. 214062 江苏无锡, 苏州大学附属第四医院暨无锡市第四人民医院肿瘤内科; 2. 南京得康生物技术有限公司

通信作者: 时宏珍, E-mail: shi_hongzhen@deconbio.com

作者简介: 杭晓声 (1963-), 男, 本科, 副主任医师, 主要从事恶性肿瘤的治疗

导原则》的要求进行,经医院伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。患者入选标准:年龄大于 18 岁的晚期 NSCLC 患者,先前可接受手术、化疗、放疗和靶向治疗,但最后一次接受这些治疗至接受 DC 免疫治疗至少间隔 4 周以上;重要脏器功能正常,无自身免疫疾病,卡氏评分 >60 分,预计生存期超过 3 月,患者同期均未进行其他治疗。排除标准:怀孕或哺乳期妇女,脏器移植者:如肝、心脏和肾等,严重的不可控制的感染,阻碍签署及理解知情同意者以及严重自身免疫性疾病。

1.1.2 试验设计 本试验是非随机的,患者分成 2 组。试验组与对照组的患者均先前接受过标准的肿瘤治疗。入选后,试验组的患者进行 DC 免疫治疗,对照组的患者可接受最佳支持治疗。主要终点指标:总生存期(overall survival, OS)。

1.1.3 患者情况 总计 38 例晚期 NSCLC 患者入选,其中对照组 20 例,试验组 18 例。对照组的平均年龄为 61.0 岁(52~74 岁);男性 15 例,女性 5 例;腺癌 13 例,鳞癌 6 例,腺鳞癌 1 例;ⅢB 期 5 例,Ⅳ期 15 例。试验组的平均年龄为 60.6 岁(44~76 岁);男 12 例,女 6 例;腺癌 16 例,鳞癌 1 例,腺鳞癌 1 例;ⅢB 期 3 例,Ⅳ期 15 例。

1.2 方法

1.2.1 热休克凋亡肿瘤细胞株抗原的制备 肺癌细胞株(鳞癌: NCEH1299 与 SK-MSE-1; 腺癌: A549 与 Lung793)采购自 ATCC。细胞株培养按常规细胞培养的方法进行,培养的细胞经 42℃ 热休克 3 h,再将细胞移置 37℃,加入 10 μ g/ml 细胞凋亡药物白桦脂酸,5% CO₂ 培养箱诱导 36~48 h 后收获细胞待用,用 Annexin-V 和 PI 染色法检测细胞的凋亡率。收获的细胞再在 -80℃ 和 37℃ 反复冻融,ELISA 法检测细胞匀浆中 HSP60 与 HSP70 的水平,锥虫蓝检测无活细胞后进行无菌和内毒素的检测,合格后冻存备用。

1.2.2 DC 的制备 取患者经造血动员后抗凝外周血 100~200 ml,常规 Ficoll 分离外周血单个核细胞,贴壁法获得单核细胞。单核细胞以含 100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4 的 10% 自体血浆的 RPMI 1640 培养液进行培养,第 5 天收获未成熟 DC(imature DC, imDC),加入未成熟 DC 1/3 数量的上述热休克诱导的肿瘤细胞抗原进行负载,孵育 24 h 后,加入终浓度为 10 ng/ml 的 rhIL-1 β 、10 μ g/ml 的 PGE-2、20 ng/ml 的 rhTNF- α 继续孵育 24 h,诱导 DC 成熟,收获成熟 DC(mature DC, mDC),流式检测 DC 的表型。

1.2.3 内毒素和无菌的检测 内毒素和无菌的检测按《中华人民共和国药典》2010 版规定的方法进行。内毒素 ≤ 5 EU/ml 判定为合格,无菌培养观察 14 天无菌生长判定为合格。

1.2.4 DC 免疫注射 细胞重悬于 2 ml 的 0.9% 氯化钠溶液中,在腹股沟淋巴结富集区 10 cm 范围内皮内注射,左右腹股沟共四点各注射 0.5 ml。每周一次,每次剂量细胞数量不少于 4×10^6 ,患者至少接受 2 次 DC 免疫回输。

1.2.5 临床观察与评估 在每次注射后 30 min 及 24 h,对注射点及患者是否出现急性过敏反应进行监控并做及时处理。治疗过程中,根据 NCI 毒性标准(National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, NCI-CTC)观察患者是否出现不良反应。治疗接受后,根据实体瘤疗效评估标准(RECIST)进行评估。

1.3 统计学方法

总生存期的比较采用 Kaplan-Meier 生存分析法,Log rank 检验进行显著性比较。

2 结果

2.1 抗原质量检测

Annexin-V 和 PI 染色法检测热休克诱导凋亡的肿瘤细胞株的平均凋亡率为 76.32%;锥虫蓝检测无活细胞,内毒素和无菌检测均为阴性;ELISA 法检测热休克诱导的肿瘤细胞匀浆中 HSP60 和 HSP70 的水平较对照组明显升高,结果见表 1。

表 1 对照组和实验组热休克诱导肿瘤细胞 HSP60 和 HSP70 表达水平的变化(ng/mg)

Table 1 Changes of the HSP60 and HSP70 level of heat shock apoptosis tumor cells in control and test group(ng/mg)

Groups	HSP60	HSP70
Control group	735.4 \pm 129.3	369.1 \pm 57.6
Test group	3613.6 \pm 403.7	2811.4 \pm 359.8

Note: Control group: apoptosis after 37℃ for 3 hours; Test group: apoptosis after 42℃ for 3 hours

2.2 DC 表型分析

收获 imDC 与 mDC 进行锥虫蓝染色与计数,细胞存活率大于 99%。流式细胞检测 DC 表型。结果显示, mDC 中 CD11c⁺ CD14⁻ 细胞比例为(86.12 \pm 3.45)%, CD11c⁺ HLA⁻ DR⁺ 细胞比例为(83.46 \pm 4.37)%, imDC 中 CD11c⁺ CD14⁻ 细胞比例为(84.23 \pm 4.70)%, CD11c⁺ HLA⁻ DR⁺ 细

胞比例为 $(85.28 \pm 5.78)\%$ ，两者比较无明显差异。而 mDC 中 $CD11c^+ CD80^+$ 细胞比例为 $(52.24 \pm 5.68)\%$ ， $CD11c^+ CD83^+$ 细胞比例为 $(61.23 \pm 5.79)\%$ ， $CD11c^+ CD86^+$ 细胞比例为 $(92.35 \pm 8.94)\%$ ，显著高于 imDC 中 $CD11c^+ CD80^+$ 细胞比例 $(3.87 \pm 1.45)\%$ ， $CD11c^+ CD83^+$ 细胞比例 $(6.34 \pm 1.89)\%$ ， $CD11c^+ CD86^+$ 细胞比例 $(7.42 \pm 2.45)\%$ ，见图 1。

2.3 安全性

试验组患者在 DC 免疫治疗的过程中，没有发生Ⅲ级以上的不良反应。1 例患者 DC 免疫治疗后 24 小时内出现一过性发热，未予特殊处理自愈。

2.4 临床反应

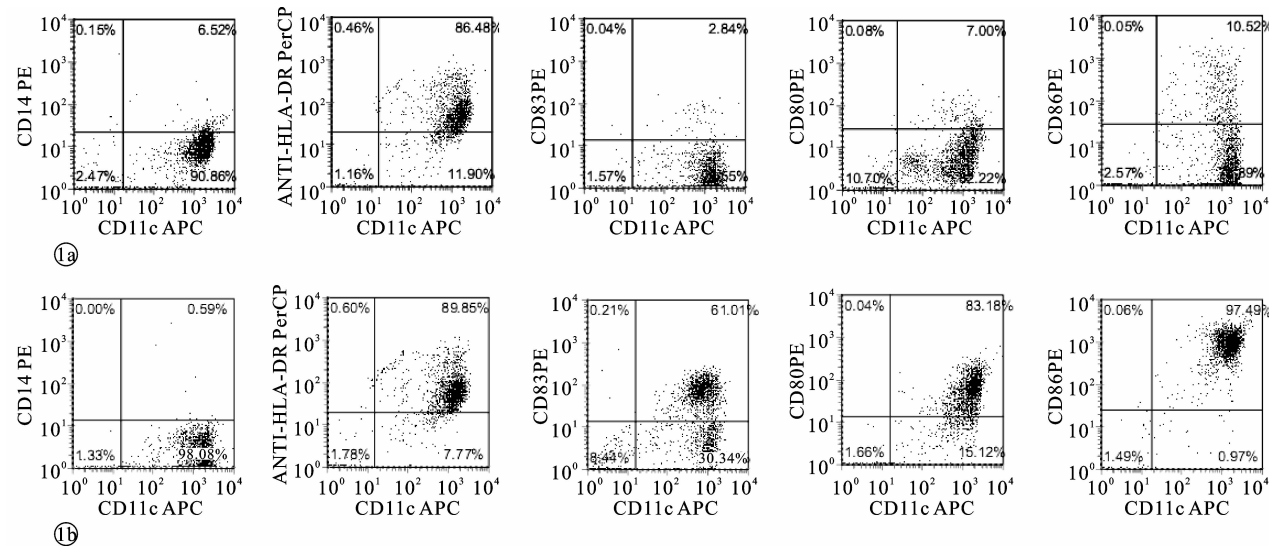
试验组中 1 例 PR，4 例 SD，13 例 PD，其中有 4 例患者生存期超过 1 年，这 4 例中有 3 例患者截至随访时均存活：1 例患者（患者 4）分别在 2008 年 6 月和 10 月各接受来了 2 次 DC 免疫治疗，无进展生存期达到 19.5 月。1 例患者（患者 1）分别在 2008 年 6 月和 12 月各接受来了 2 次 DC 免疫治疗，无进展生存期达到 24.7 月。1 例患者（患者 11）进行了 2 次 DC 免疫治疗，虽然进展，但截至随访时仍存活了 15.5 月并继续生存。对照组中 3 例 SD，17 例进展，其中也有 3 例患者生存期超过 1 年，但是截至随访时，只有 1 例患者继续生存，见表 2、3。比较总生存期，试验组的中位生存期为 9.2 月，对照组的中位生存期为 7.2 月，两组比较差异无统计学意义 $(P = 0.543)$ ，见图 2。

表 2 实验组患者情况

Table 2 Characteristics of patients in test group

No.	Age	Gender	Pathology	Stage	Previous therapy	No of vaccination	Clinical evaluation
1	56	F	adenocarcinoma	IV	Sg+CT	4	SD
2	44	M	adenocarcinoma	IV	CT+TT	2	PD
3	63	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	2	PD
4	60	F	adenocarcinoma	IV	CT	2	PR
5	55	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	4	PD
6	75	M	adenocarcinoma	IV	CT+TT	2	PD
7	57	M	adenocarcinoma	IIIb	CT	2	PD
8	72	M	adenocarcinoma	IV	CT	2	PD
9	67	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	2	PD
10	59	F	adenocarcinoma	IV	Sg+CT+RT+TT	4	PD
11	67	F	squamous carcinoma	IIIb	CT+RT+TT	2	SD
12	60	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	4	PD
13	47	M	adenocarcinoma	IIIb	Sg+CT+TT	4	SD
14	63	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	2	PD
15	47	F	adenosquamous carcinoma	IV	Sg+CT+TT	2	PD
16	69	F	adenocarcinoma	IV	CT+RT+TT	4	SD
17	76	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT	4	PD
18	54	M	adenocarcinoma	IV	CT+RT+TT	2	PD

Note: Sg: surgery; CT: chemotherapy; RT: radiotherapy; TT: targeted therapy; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease



1a; Phenotype of immature DC in one patient ;1b; Phenotype of mature DC in one patient

图 1 一名 NSCLC 患者 imDC 和 mDC 表型检测图

Figure 1 Phenotype of immature and mature DC in one NSCLS patient

表 3 对照组患者情况

Table 3 Characteristics of patients in control group

No.	Age	Gender	Pathology	Stage	Previous therapy
1	70	M	squamous carcinoma	III B	CT
2	61	M	adenocarcinoma	IV	Sg + CT + RT
3	66	F	adenocarcinoma	IV	CT + RT
4	55	M	adenocarcinoma	III B	CT
5	67	M	squamous carcinoma	IV	CT + RT
6	66	M	squamous carcinoma	IV	CT
7	58	F	adenocarcinoma	IV	CT + TT
8	63	F	adenocarcinoma	IV	CT + RT
9	55	F	adenocarcinoma	IV	CT + RT + TT
10	52	M	adenocarcinoma	III B	CT + RT
11	53	M	adenocarcinoma	IV	CT
12	61	M	adenosquamous carcinon	III B	Sg + CT
13	65	M	squamous carcinoma	IV	CT
14	72	M	squamous carcinoma	III B	Sg + CT
15	63	M	adenocarcinoma	IV	CT + RT
16	61	F	squamous carcinoma	IV	CT + RT + TT
17	53	M	adenocarcinoma	IV	CT + RT
18	54	M	adenocarcinoma	IV	CT
19	74	M	adenocarcinoma	IV	Sg + CT
20	52	M	adenocarcinoma	IV	CT + TT

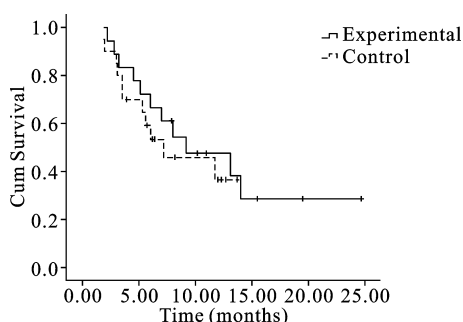


图 2 对照组和实验组的总生存期比较

Figure 2 Overall survival in control and test groups

3 讨论

DC是迄今为止已知的体内功能最为强大的专职抗原递呈细胞,是启动、调控并维持免疫应答的中心环节。经抗原刺激后的DC细胞向淋巴结迁移,将其携带的抗原信息传递给相应的T淋巴细胞,启动、激发T细胞免疫应答,特异性地杀灭肿瘤细胞,特别的是,DC还能在体内诱发免疫记忆,同时经抗原刺激后的DC还可增强机体的非特

异性免疫应答^[7-8]。自从上世纪90年代中期首次报道了肿瘤的DC免疫治疗以来^[8],肿瘤的DC免疫治疗一直是肿瘤的生物治疗的热点,具统计,截至2009年之前,已经有数百个临床试验超过3000例的DC免疫治疗报道,显示了良好的安全性和一定的有效性^[9-10]。最新的一个案例是Dendreon公司的采用重组PAP蛋白负载DC治疗激素非依赖的晚期前列腺腺癌患者,中位生存期比较对照组提高了4.1月,已经被FDA批准上市^[11]。

抗肿瘤免疫启动的关键一步是抗原递呈细胞有效地递呈肿瘤抗原,肿瘤抗原的抗原性和免疫原性直接影响着DC免疫治疗的效率。NSCLC的DC免疫治疗报道相对较少,与前列腺癌不同,NSCLC还没有相对明确的肿瘤特异性抗原,晚期NSCLC患者大多又无法取得肿瘤组织,因此,采用细胞株进行负载是个恰当的选择,细胞株负载的DC免疫治疗也多有报道^[6]。研究发现,HSPs(heat shock proteins)是天然的免疫佐剂,热休克蛋白可同时增强肿瘤抗原的免疫原性与抗原性;热休克蛋白能结合细胞内5-25氨基酸的多肽(包括肿瘤抗原)形成HSP-多肽复合物,DC表达多种HSP受体如CD91,可通过HSP受体介导机制提高抗原负载效率^[12]。

在影响DC免疫治疗疗效的因素中,DC的数量、纯度和成熟情况也很重要。虽然一般认为,DC免疫治疗没有明确的量效关系,文献报道的DC免疫回输的数量差异也很大^[9],一定数量的DC对免疫治疗也是必需的,Um等^[13]报道对于晚期NSCLC患者, 1.2×10^7 的DC也是可以耐受的,该研究每次DC的回输量不少于 4×10^6 ,最大剂量为 9.2×10^6 。一些文献推荐每次DC免疫治疗DC的纯度不低于75%,该研究每次DC免疫治疗的纯度均大于80%。据报道,未成熟的DC可以使机体产生更多的IL-10来诱导免疫耐受^[14-15],其迁移能力也受限^[12,16]。CD80、CD83、CD86是DC成熟的重要分子,该研究比较了每例患者的imDC和mDC的表面分子标记,imDC和mDC的CD11c⁺CD14⁺细胞与CD11c⁺HLA-DR⁺细胞百分率比较无明显差异,但mDC中的CD80⁺细胞、CD83⁺细胞及CD86⁺细胞百分率明显高于imDC。

虽然DC免疫治疗有良好的安全性,但与对照组相比,DC免疫治疗组并未显示出明显的OS优势,分析可能的原因有:首先,DC免疫治疗的

患者都是晚期 NSCLC 患者,肿瘤的负荷大,晚期肿瘤患者的基础免疫状态本身就处在一个较低的水平,免疫治疗更可能靶向于少量的肿瘤细胞或者缓解期微小残存病(Minimal Residual Disease, MRD)^[17];其次,肿瘤的抗原性,采用的细胞株与患者自身的肿瘤细胞的生物学特征存在差异;再次,该研究的样本较小,需要更大样本的数据进行统计学分析。虽然未能达到统计学意义,但 DC 免疫治疗晚期 NSCLC 患者仍然值得继续研究。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Navada S, Lai P, Schwartz AG, et al. Temporal trends in small cell lung cancer; analysis of national Surveillance Epidemiology and End-Results (SEER) database [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(18 suppl): S384.
- [3] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5): 584-594.
- [4] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocyte prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity [J]. Nature, 2001, 410(6832): 1107-1111.
- [5] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. Nature, 1998, 392(6673): 245-252.
- [6] Hirschowitz EA, Foody T, Kryscio R, et al. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(14): 2808-2815.
- [7] Wakim LM, Waithman J, van Rooijen N, et al. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues [J]. Science, 2008, 319(5860): 198-202.
- [8] Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(17): 8078-8082.
- [9] Zhong H, Shurin MR, Han B. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy for cancer [J]. Expert Rev Vaccines, 2007, 6(3): 333-345.
- [10] Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccines [J]. Cancer Invest, 2003, 21(6): 873-886.
- [11] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 363(5): 411-422.
- [12] De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state [J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 12-17.
- [13] Um SJ, Choi YJ, Shin HJ, et al. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2010, 70(2): 188-194.
- [14] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 767-811.
- [15] Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node [J]. Nat Immunol, 2003, 4(8): 733-739.
- [16] Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tüting T, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T cell responses in humans following intranodal injection [J]. Int J Cancer, 2001, 93(2): 243-251.
- [17] Hoos A, Parmiani G, Hege K, et al. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics [J]. J Immunother, 2007, 30(1): 1-15.

[编辑校对:刘红武]