

树突状细胞-细胞因子诱导杀伤细胞免疫治疗预计生存期低于3月的晚期恶性肿瘤患者

赵艳杰,宋雨光,张红梅,姜妮,朱希山,王小利,周心娜,杨化兵,任军



Clinical Analysis of Patients Suffering from Advanced Malignancy with Survival Time Less Than 3 Months by DC-CIK Cells

ZHAO Yanjie, SONG Yuguang, ZHANG Hongmei, JIANG Ni, ZHU Xishan, WANG Xiaoli, ZHOU Xinna, YANG Huabing, REN Jun

Department of Medical Oncology, Beijing Shijitan Hospital, CMU, Beijing 100038, China

Corresponding Author:REN Jun,E-mail:renjun9688@yahoo.com

Abstract: Objective To investigate whether the patients suffering from advanced malignancy with expected survival time less than 3 months will benefit from DC-CIK immunotherapeutic treatments. **Methods** Thirteen eligible patients with ECOG performance greater than 3 and expected survival time less than 3 months, were treated with DC-CIK immunotherapy. The level of peripheral blood T lymphocytes subsets were measured before and after DC-CIK infusions. The primary observations were the changes in ECOG performance, overall survival and adverse reactions. **Results** The levels of CD3+T cells were increased and CD8+CD28- T cells were reduced in two months after the last DC-CIK treatment, with statistical significance. Through the DC-DIK treatment, the ECOG performance improved in 11 patients and overall survival of the 11 patients was prolonged for 3 months. And there were 7 patients still alive at the end of follow-up (already more than 6 months). No severe adverse reactions occurred. **Conclusion** DC-CIK immunotherapy is effective and safe for advanced cancer patients with expected survival less than 3 months.

Key words: Malignancy;Immunotherapy;Dendritic cell(DC);Cytokine-induced killer(CIK)

摘要: 目的 探讨预计生存期小于3月的晚期肿瘤患者是否会从DC-CIK治疗中获益。**方法** 对13例预计生存期小于3月、ECOG评分大于3的患者进行DC-CIK治疗,同时检测治疗前后T淋巴细胞亚群的变化,对比治疗前后ECOG评分的变化,统计OS,观察不良反应。**结果** 末次DC-CIK治疗后两个月与治疗前对比,CD3+T细胞的增加和CD8+CD28-T细胞的减少差异有统计学意义。通过DC-CIK治疗11位患者ECOG评分得到改善,11位患者OS大于预计的3月,而且有7位患者至随访末仍然生存(均已大于6月),无明显不良反应发生。**结论** 预计生存期小于3月的晚期肿瘤患者行DC-CIK治疗,是安全有效的。

关键词: 恶性肿瘤;免疫治疗;树突状细胞;细胞因子诱导杀伤细胞

中图分类号: R703.51 **文献标识码:** A

0 引言

至2009年美国FDA批准了全球第一个细胞免疫治疗产品以来,细胞免疫治疗肿瘤的有效性逐渐被认可,并广泛应用于临床。有研究^[1]指出把癌症的免疫治疗作为2013年人们注重的六大科技任务之一。临床上,对于早期及ECOG(eastern cooperative oncology group,ECOG)评分小于2的患者,治疗上可以选择手术及放化疗为主和(或)联合免疫治疗。但对于预计生存期小于3月、ECOG大于3的晚期患者,缺乏有效的治疗方法,常以姑息对症为主,患者生活质量差,生存期短。单纯细胞免疫治疗是否有助于改善这一现状,目前报道甚少。我科对于该类患者试用树突状细胞(dendritic cell,DC)-细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer,CIK)即DC-CIK疗法取得了较理想疗效,现报道如下。

收稿日期: 2013-03-27; 修回日期: 2013-07-15
作者单位: 100038 北京, 首都医科大学附属北京世纪坛医院肿瘤内科
通信作者: 任军, E-mail: renjun9688@yahoo.com
作者简介: 赵艳杰(1977-),女,硕士,主治医师,主要从事肿瘤的免疫治疗及肺癌的内科治疗

1 资料和方法

1.1 研究对象

自2012年7月—2012年12月,13例恶性肿瘤晚期患者在首都医科大学附属北京世纪坛医院肿

瘤内科进行了DC-CIK免疫治疗，其中男10例，女3例，年龄39~83岁，ECOG评分3~4分，其中肺癌5例、胆管癌2例、前列腺癌1例、食管癌1例、淋巴瘤1例、胰腺癌1例、卵巢癌1例、胃癌1例。所有患者均为预计生存期小于3月的Ⅳ期患者（生存期的预测主要根据中国预后量表—Chinese Prognostic Scale,ChPS）^[2-3]。患者一般资料及治疗情况见表1。所有患者在DC-CIK治疗前3月及DC-CIK治疗后均未接受放化疗。患者及其法定代理人知情并同意接受该治疗。随访时间均大于6月，OS大于6月的患者至随访结束时仍然存活。

1.2 主要试剂来源

G-CSF为日本中外制药株式会社产品。T细胞亚群检测的抗体均为美国Beckman Coulter公司产品。干扰素-γ为上海凯茂生物医药有限公司产品，IL-2为北京四环生物制药有限公司产品，CD3单抗为北京同力海源生物技术开发公司产品，TNF-α、IL-4、GM-CSF为厦门特宝生物股份有限公司产品。

1.3 T细胞亚群的检测

T细胞亚群检测采用流式细胞仪。a~f六管中分别加标有荧光的抗体10 μl，加50 μl血液样本，振荡，室温避光放置15 min后加BD溶血素400 μl，室温避光放置8 min后加入2 ml PBS液，室温1500 r/min离心5 min，弃液留底部细胞加入400 μlPBS液，振荡后上机检测。

1.4 DC-CIK细胞悬液的制备

G-CSF刺激造血后外周血白细胞>10×10⁹/L、淋巴+单核>15%后，分两天采集外周血单个核细胞200~250 ml。取采集物25~50 ml（剩余的-80℃分袋冻存备用）用0.9%氯化钠溶液1:1稀释，缓慢加入淋巴细胞分层液表面上，无菌封盖，400 g，30 min，轻轻吸细胞层，用0.9%氯化钠溶液1 500 r/min，离心5 min，洗三次。细胞计数后，按5×10⁶/ml的细胞浓度分3瓶培养，每瓶加入完全培养液（含2.5%自体血浆的1640培养液）60~80 ml，放入5%的CO₂ 37℃培养箱中培养2~4 h后。悬浮细胞进行CIK培养，贴壁细胞进行DC培养。然后将细胞悬液送细菌培养。

CIK培养：合并细胞悬液并移入完全培养液（含自体血浆的AIM-V），1L AIM-V培养液中加入各种细胞因子[干扰素-γ 1 ml（即全部加到1L AIM-V中），IL-2 1 200 μl，CD3单抗5~10 μl并首次加1支肝素]，放入5% CO₂培养箱中培养。

DC培养：贴壁细胞加入DC培养液和各种

细胞因子[TNF-α(30 μl/30 ml)，IL-4（60 μl/30 ml），GM-CSF(60 μl/30 ml)]放入5% CO₂培养箱中培养。隔日镜下观察，根据细胞数量及培养液颜色，补充完全培养液和细胞因子（含2.5%自体血浆AIM-V加补IL-2终浓度1 μl/ml）。回收细胞数量大于1×10⁸，0.9%氯化钠溶液低速离心，洗三次。用适量含有12.5%血浆蛋白的0.9%氯化钠溶液重悬细胞，回输患者。

1.5 免疫治疗方案及随访

所有患者接受DC-CIK免疫治疗，在外周血单状核细胞分离后7~10天进行细胞回输，最低细胞数量大于1×10⁸，隔日1次，每周期3次。每周期间隔1~2月。外周血干细胞动员前及每周期回输后2月行外周血T细胞亚群检测。所有患者随访至2013年3月。

1.6 统计学方法

所有数据均以平均值±标准差表示，配对t检验，采用SPSS 19.0软件包分析，以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC和CIK的免疫表型

DC表达CD83、MHC-I、MHC-II、CD80、CD86（B7-2），CIK表达CD3、CD56。

2.2 治疗前后T细胞亚群的变化

对比治疗前及最后一个周期免疫治疗后2月的T细胞亚群变化发现，CD3+、CD3+CD4+、CD3+CD8+、D3+CD16+CD56+、CD8+CD28+百分比有明显上升，CD3-CD16+CD56+、CD4+CD25+、CD8+CD28-百分比有明显下降，但只有CD3+和CD8+CD28-的变化P值小于0.05，差异有统计学意义，见表2。

2.3 患者生活质量的改善和生存期的延长

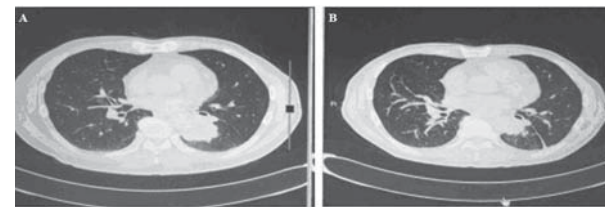
除2例患者治疗前后ECOG评分无改善外，13例患者中7例ECOG评分降低1分，4例降低2分。13例患者中仅2例OS小于3月，分别为2.6和2.3月，有7例患者在随访结束时仍然存活，OS大于6月，远远超过预计的3月，见表3。

2.4 疗效显著的病例治疗前后影像学改变

下图为编号7的患者贾某，DC-CIK治疗前后胸部CT的对比，左肺占位明显缩小，见图1。

2.5 不良反应

除1例患者（编号5）出现体温为37.9度的低热外，其余患者均未出现明显不良反应。



A: before treatment; B: after treatment
图1 疗效显著患者治疗前后胸部CT的对比
Figure1 Chest CT of a typical patient before and after treatment

3 讨论

DC细胞是机体重要的抗原递呈细胞，在介导免疫细胞的抗肿瘤活性中起着重要的作用。CIK细胞是非组织相容性复合物（MHC）和非T细胞受体(TCR)限制性的免疫活性细胞^[4]，既具有T细胞的抗肿瘤活性又具有NK细胞的非MHC限制性抗肿瘤作用，抗肿瘤谱广。相对于单独培养的CIK细胞，DC-CIK的抗肿瘤活性明显增强，增殖速度快并且凋亡速度慢，CD3+CD56+细胞比例更高^[5-6]，并且对多药耐药的肿瘤细胞的疗效更好^[7]。

已有多篇文献报道术后联合DC-CIK、化疗联合DC-CIK的有效性和安全性^[8-9]，但对于预计生存期小于3月、ECOG评分大于3的晚期患者，DC-CIK治疗报道甚少。晚期肿瘤患者多伴有免疫缺陷^[10-12]，严重的免疫抑制可能是肿瘤迅速恶化的原因之一。我们的治疗经验表明，选择DC-CIK治疗的晚期患者，在OS延长的同时，ECOG也

表3 DC-CIK治疗前后生活质量及生存期的变化
Table3 Diversification of ECOG and OS before and after DC-CIK treatment

Patient's No.	Cycles of DC-CIK treatment	Pre-treatment	Post-treatment	OS (months)
1	3	4	3	4.5
2	2	3	2	5.5
3	2	4	2	>6
4	1	3	2	5.5
5	2	4	3	>6
6	3	4	3	>6
7	3	4	2	>6
8	1	4	4	2.6
9	1	4	3	4
10	2	4	2	>6
11	2	3	1	>6
12	1	3	2	>6
13	1	4	4	2.3

有不同程度的改善，并且没有明显的不良反应。说明对于晚期患者来说，DC-CIK治疗是可选的、有效的、安全的治疗手段。

肿瘤的发生、发展及预后和机体的免疫功能尤其是T细胞的免疫功能密切相关^[13]，T细胞亚群的构成比能够客观的反映出机体免疫系统对肿瘤的反应状态。研究表明，许多肿瘤患者存在T淋巴细胞亚群失衡^[14-15]。CD3+细胞为总T淋巴细胞，代表机体总的肿瘤免疫反应状态。我们的研究结果表明，DC-CIK治疗后，CD3+T细胞的百分比明显高于治疗前（ $P<0.05$ ），说明治疗前后患者的机体对肿瘤的免疫反应状态有所改善。CD8+CD28-

表1 患者一般情况及治疗情况

Table1 Clinical data of patients

Patient's No.	Age(years)	Gender	Primary disease	Metastatic sites	Stage	Cycles of DC-CIK treatment
1	75	Male	Prostate cancer	Bone	IV	3
2	48	Male	Esophageal cancer	Lymph node, liver	IV	2
3	78	Male	Lymphoma	Prostate, pelvic	IV	2
4	75	Male	Lung cancer	Bone	IV	1
5	77	Male	Lung cancer	Lung, pleura	IV	2
6	75	Male	Cholangiocarcinoma	Brain,subcutaneous	IV	3
7	61	Male	Lung cancer	Lung, brain	IV	3
8	75	Male	Pancreatic Cancer	Bone	IV	1
9	68	Male	Cholangiocarcinoma	Omentum,abdominal lymph	IV	1
10	83	Female	Gastric cancer	Bone	IV	2
11	39	Male	Lung cancer	Lung, brain	IV	2
12	66	Female	Ovarian Cancer	Bone, abdominal cavity	IV	1
13	55	Female	Lung cancer	Lung, bone, brain	IV	1

表2 治疗前和最后1周期免疫治疗2月后外周血T淋巴细胞亚群分析统计结果

Table2 Peripheral blood T lymphocytes subsets proportions before and after the last treatment

Time	CD3+ (%)	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)	CD3-CD16+CD56+ (%)	CD3+CD16+CD56+ (%)	CD4+CD25+ (%)	CD8+CD28- (%)	CD8+CD28+ (%)
Pre-treatment	62.68±3.57	34.75±3.03	29.00±3.87	18.70±2.60	17.71±5.49	4.61±0.96	33.64±4.37	8.68±1.37
Post-treatment	82.50±4.06	37.77±5.07	39.71±5.88	11.55±2.37	18.83±3.50	3.22±0.78	19.36±3.59	13.36±2.33
t	-3.685	-0.654	-1.875	1.960	-0.161	1.154	3.705	-2.047
P	0.003	0.525	0.085	0.074	0.875	0.271	0.003	0.063

即抑制性T细胞（Ts细胞），该细胞通过细胞间直接接触的特异性免疫抑制及分泌可溶性免疫抑制因子的非特异性免疫抑制的双重机制抑制机体免疫功能^[16]。有学者认为，当外周血中CD8+CD28-比例明显增高时意味着肿瘤有恶化或复发的风险，故CD8+CD28-可作为肿瘤患者预后判断的指标^[17]。我们的研究表明，DC-CIK治疗前后的晚期肿瘤患者，Ts细胞明显下降（ $P < 0.05$ ），说明晚期肿瘤患者的免疫抑制状态在治疗后得到一定改善。本研究目前病例数尚少，随着治疗患者数目的增加，将有望得到更有说服力的数据。

总之，我们的研究表明，对于预计生存期小于3月的晚期肿瘤患者，尽管DC-CIK治疗难以获得CR或PR这样的疗效，但可以有效纠正患者的免疫抑制状态，并由此使患者的生活质量明显改善，OS显著延长。

参考文献:

[1] Cho A. Breakthrough of the year. The discovery of the Higgs boson[J]. Science,2012,338(6114):1524-5.

[2] Lingjun Z, Jing C, Jian L,*et al.*Prediction of survival time in advanced cancer: a prognostic scale for Chinese patients[J]. J Pain Symptom Manage,2009,38(4):578-86.

[3] Liu Y, Yu SY. Survival prediction of patients with advanced cancer[J]. Zhong Liu,2011,31(2):165-8.[刘勇,于世英.晚期癌症患者生存期的预测 [J].肿瘤,2011,31(2): 165-8.]

[4] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA,*et al.*Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition o f cytokine -induced killer cells[J]. Exp Hematol,1993,21(13):1673-9.

[5] Yang L, Ren B, Li H,*et al.*Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small-cell lung cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother.2013,62(1):65-73.

[6] Wang QJ, Wang H, Pan K, *et al.*Comparative study on anti-tumor immune response of aut- ologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC -CIK), and semi-allogeneic DC -CIK[J]. Chin J Cancer,2010,29(7):641 -8.

[7] Li SJ, Zhang LS, Chai Y,*et al.* Killing activity of co-cultured cytokine-induced killer cells and dendritic against multi-drug resistant tumor cells line[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,

2007,29(10):733-6. [李世俊，张连生，柴晔，等.树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养对多药耐药肿瘤细胞系的杀伤活性[J]. 中华肿瘤杂志,2007,29(10):733-7.]

[8] Ren J,Di L,Song G,*et al.*Selections of appropriate regimen of high-dose chemotherapy combined with adoptive cellular therapy with dendritic and cytokine-induced killer cells improved progression-free and overall survival in patients with metastatic breast cancer: reargument of such contentious therapeutic preferences[J]. Clin Transl Oncol,2013,15(10):780-8.

[9] Zhan HL, Gao X, Pu XY,*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(21):3771-7.

[10] Tiwari M. From tumor immunology to cancer immunotherapy: miles to go[J]. J Cancer Res Ther,2010,6(4):427-31.

[11] Duray A, Demoulin S, Hubert P, *et al.* Immune suppression in head and neck cancers: a review[J].Clin Dev Immunol,2010,2010: 701657.

[12] Kim R, Emi M, Tanabe K,*et al.* Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression[J]. Cancer Res,2006,66(11):5527-36.

[13] Kuss I, Hathaway B, Ferris RL,*et al.* Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Clin Cancer Res,2004,10(11):3755-62.

[14] Decensi A, Costa A. Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer[J]. Eur J Cancer, 2000,36(6):694-709.

[15] Lissoni P,Brivio F,Ferrante R,*et al.* Circulating immature and mature dendritic cells in relation to lymphocyte subsets in patients with gastrointestinal tract cancer[J]. Int J Biol Markers,2000,15(1):22-5.

[16] Li YS,Wang L,Chen XL.Research progress of regulatory CD8+CD28-T cells in biological features and related diseases[J]. Mian Yi Xue Za Zhi,2012,28(8):722-5. [李雅舒,王莉,陈晓玲. CD8+CD28-调节性T细胞的生物学特性及其与疾病的相关性研究进展[J]. 免疫学杂志,2012,28(8):722-5.]

[17]Zou W.Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance[J]. Nat Rev Cancer,2005,5(4):263-74.

[编辑：黄国玲；校对：邱颖慧]