

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.002

· 研究快报 ·

GM-CSF 修饰肿瘤细胞疫苗治疗前后肺癌患者 Treg 的变化及其临床意义

杜春娟^{1,2}, 于津浦², 李慧², 张乃宁¹, 滕艳华¹, 李蓁¹, 安阳², 曹水^{1,2*}, 任秀宝^{1,2} (1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 天津 300060; 2. 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060)

专家点评 近20年来,肿瘤免疫治疗研究历经了一个逐渐降温,而后又逐步复温,到再次受到广泛关注的“起伏”阶段。其中,缺乏有效的疗效评价指标是主要原因之一。肿瘤免疫治疗主要通过激活机体抗肿瘤免疫应答,诱导免疫系统杀伤肿瘤细胞而发挥作用。而机体产生抗肿瘤免疫应答需要一定的时间,疗效的显现常常是“滞后”的,肿瘤体积在一定时间内可能并无明显变化,甚至因形成瘢痕组织而使肿块并不缩小或消失。因此,肿瘤免疫治疗不能单纯地通过肿瘤大小变化来评价疗效。目前,提倡综合性的疗效评价方法,包括实验室指标(如血清中肿瘤标志物的变化)、影像学指标(如目标病灶的总体积/总长径的变化、SUV值或CT值的变化等)、生活质量是否改善及生存期有无延长等。近来,免疫学相关指标作为肿瘤免疫治疗疗效评价指标的研究已逐步兴起。免疫学相关指标是否能成为肿瘤免疫治疗有效的疗效评价指标,是否能成为上述综合性疗效评价方法的一部分,需要更多的基础及临床研究。

本期刊登杜春娟、任秀宝等人的论文,作者以GM-CSF基因修饰的肿瘤细胞疫苗(GVAX)治疗肺癌患者,研究观察到,经GVAX治疗后的肺癌患者,其外周血Treg比例明显下降;Treg下降患者的生存期显著长于Treg升高患者,且晚期肺癌患者生存期的延长更明显。论文研究结果显示,治疗前后患者外周血Treg比例的变化有望成为评价GVAX治疗肺癌疗效的免疫学指标。该研究是探索肿瘤免疫治疗疗效评价指标的良好开端。

南方医科大学 附属南方医院 副院长兼肿瘤中心主任
中国抗癌协会 肿瘤标志专业委员会 副主任委员
中国抗癌协会 临床肿瘤学协作专业委员会 副主任委员



[摘要] 目的:观察GM-CSF基因修饰的肿瘤细胞疫苗(GM-CSF modified tumor cell vaccine, GVAX)治疗前后肺癌患者外周血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)比例的变化,探讨其与肺癌临床病理特征的关系及对患者生存的影响。方法:选择2007年3月至2010年7月天津医科大学附属肿瘤医院接受GVAX治疗的85例肺癌患者,其中鳞癌28例、腺癌47例、小细胞癌10例,早期(I~III A期)23例、晚期(III B~IV期)62例。流式细胞术检测患者GVAX治疗前后外周血Treg的比例,分析治疗前后Treg比例变化与肺癌临床病理特征和患者生存期的关系。结果:接受GVAX治疗的85例肺癌患者1、3年的生存率分别为69.3%、48.2%,治疗后外周血Treg比例明显下降[(4.86±2.52)% vs (5.52±2.68)%, P<0.05]。患者血清LDH水平正常组治疗后Treg比例明显下降[(4.50±2.23)% vs (5.59±2.76)%, P<0.05],而LDH增高组治疗后Treg比例上升[(6.04±3.07)% vs (5.31±2.48)%, P<0.05];GVAX治疗超过1个疗程者较治疗1个疗程者治疗后Treg比例下降更明显[(-0.39±2.39)% vs (-2.11±1.62)%, P<0.05]。治疗前后外周血Treg比例的变化与患者预后相关,治疗后Treg比例下降组患者中位总生存期(overall survival, OS)明显长于升高组(21个月 vs 10个月, P<0.05),晚期肺癌患者中Treg比例下降者的OS延长更明显(18个月 vs 8个月, P<0.05)。结论:肺癌患者GVAX治疗前后外周血Treg比例变化可能成为评价GVAX疗效及判断患者预后的免疫指标,GVAX治疗后患者Treg比例的下降提示其疗效和预后都较好。

[关键词] 肺癌;GM-CSF修饰肿瘤细胞疫苗;调节性T细胞;乳酸脱氢酶;疗效;预后;疗效评价指标

[中图分类号] R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0473-07

[基金项目] 国家科技攻关计划引导项目资助(No. 2005BA740C);天津市科技创新专项资金资助(No. 06FZZDSF01500)。Project supported by the National Key Science and Technology Research Program (No. 2005BA740C), and the Special Foundation for Science and Technology Innovation of Tianjin Province(No. 06FZZDSF01500)

[作者简介] 杜春娟(1986-),女,山东省德州市人,硕士研究生,主要从事肿瘤生物治疗的临床和基础研究

[通信作者] 任秀宝(REN Xiu-bao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com;曹水(CAO Shui, corresponding author), E-mail: caoshui@yahoo.com.*共同通信作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1625.009.html>

Changes in regulatory T cells of lung cancer patients before and after GM-CSF modified tumor cell vaccine treatment and their clinical significance

DU Chun-juan^{1,2}, YU Jin-pu², LI Hui², ZHANG Nai-ning¹, TENG Yan-hua¹, LI Zhen¹, AN Yang², CAO Shui^{1,2*}, REN Xiu-bao^{1,2} (1. Department of Cancer Biotherapy, Tumor Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the alteration in proportion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of lung cancer patients treated with GM-CSF modified tumor cell vaccine (GVAX) and its relationship to clinical characteristics and survival rate of lung cancer patients. **Methods:** Eighty-five lung cancer patients treated with GVAX in Affiliated Tumor Hospital of Tianjin Medical University were enrolled in the present study, including 28 squamous carcinoma, 47 adenocarcinoma, 10 small cell lung cancers, among which 23 in early stage (I ~ IIIA), 62 in advanced stage (IIIB ~ IV). The proportion of Tregs in the peripheral blood before and after GVAX treatment was detected by flow cytometry, and the correlation between the alteration of Treg proportional and clinicopathological characteristics and overall survival of lung cancer patients were analyzed. **Results:** One-year, 3-year survival rates of 85 patients with lung cancer treated with GVAX were 69.3% and 48.2%, respectively. The proportion of Treg in peripheral blood significantly decreased after GVAX treatment ($4.86 \pm 2.52\%$ vs $5.52 \pm 2.68\%$, $P < 0.05$). The proportion of Tregs significantly decreased in the patients with normal LDH level ($4.50 \pm 2.23\%$ vs $5.59 \pm 2.76\%$, $P < 0.05$) while increased in those with high LDH level ($6.00 \pm 3.06\%$ vs $5.30 \pm 2.47\%$, $P < 0.05$) after GVAX treatment. The proportion of Tregs decreased more dramatically in the patients treated with GVAX more than 1 course than in those patients with only 1 course ($-2.11 \pm 1.620\%$ vs $-0.39 \pm 2.39\%$, $P < 0.05$). The alteration of Treg proportion after GVAX treatment was tightly related to the prognosis of the patients. Patients with a decrease of Tregs showed longer overall survival (OS) than those displaying an increase of Treg after GVAX treatment (21 months vs 10 months, $P < 0.05$), especially patients in advanced stage (18 months vs 8 months, $P < 0.05$). **Conclusion:** The alteration of Treg proportion in peripheral blood could be a potential immunological indicator to evaluate the efficacy and prognosis of lung cancer patients who received GVAX treatment. The declining pattern of Treg after GVAX treatment implies a better prognosis of patients.

[**Key words**] lung cancer; GM-CSF modified tumor cell vaccine; regulatory T cell; LDH; efficacy; prognosis; efficacy evaluation criteria

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 473-479]

肺癌是世界范围内发病率及病死率均居前列的恶性肿瘤^[1],免疫治疗在肺癌治疗中取得了一定效果。免疫治疗包括细胞因子治疗、过继性免疫细胞治疗,如淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK)和细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)治疗、树突状细胞(dendritic cell, DC)瘤苗治疗、粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)基因修饰的肿瘤细胞疫苗(GM-CSF modified tumor vaccine, GVAX)治疗等,其中GVAX疫苗在肺癌治疗中已取得较满意的疗效^[2,3]。然而部分接受GVAX治疗患者的疗效较差,对于如何预测GVAX治疗效果,目前尚缺乏有效的临床预测指标。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是近年研究发现的具有免疫抑制作用的T淋巴细胞亚群,可

抑制机体免疫功能,并参与肿瘤免疫逃逸。多个研究^[4,6]发现,肿瘤患者外周血和肿瘤组织中Treg比例明显高于正常对照者,且与肿瘤患者预后不良明显相关;肺癌患者中也发现Treg比例明显增高^[7]。本课题前期研究^[8]发现,GVAX治疗肾癌及胃肠道恶性肿瘤后,患者外周血Treg比例降低,且与生存期延长明显相关;但肺癌患者接受GVAX治疗后Treg的变化及其与临床疗效和预后的关系尚未见报道。本研究主要观察接受GVAX治疗的肺癌患者外周血Treg比例的变化,探讨其与肺癌患者临床病理特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择2007年3月至2010年7月天津医科大学

附属肿瘤医院接受 GVAX 治疗的 85 例肺癌患者,其中男性 59 例、女性 26 例;年龄 28 ~ 81 岁,中位年龄 59 岁;吸烟 44 例,不吸烟 41 例;鳞癌 28 例,腺癌 47 例,小细胞癌 10 例;手术 44 例,未手术 41 例。KPS (Karnofsky performance status) 为 60 ~ 100 分。根据第 6 版美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 肺癌分期标准,本组患者中 I 期 9 例, II 期 6 例, III A 期 8 例, III B 期 2 例, IV 期 60 例;早期 (I ~ III A 期) 23 例,晚期 (III B ~ IV 期) 62 例。本临床试验治疗程序经医院伦理委员会审查批准,所有受试患者均签署知情同意书。

1.2 GVAX 的制备及其使用方法

GVAX 制备方法参考文献 [8]。GVAX 由“GM-CSF 分泌细胞”和“肿瘤细胞”组成,每次注射前分别取 1 支“GM-CSF 分泌细胞”和“肿瘤细胞”,融化后混合,皮下注射。患者 1 个疗程注射 6 次,一般 1 周注射 1 次或 2 次。GVAX 治疗期间不接受其他治疗。85 例肺癌患者均接受 GVAX 治疗。治疗 1 个疗程者 59 例,多于 1 个疗程者 26 例。GVAX 治疗前 2 个月均未接受其他治疗。随访日期截止于 2011 年 3 月,随访时间为 1 ~ 39 个月,中位随访时间为 17 个月。

1.3 流式细胞术检测患者外周血中淋巴细胞、T 淋巴细胞亚群与 NK 细胞的比例

GVAX 治疗前后各抽取患者清晨空腹外周静脉血 3 ml (EDTA 抗凝),送流式细胞室检测。检测方法:采用 CD3/CD4/CD8 (BD 公司)、CD3/CD16⁺56/CD45 (BD 公司) 和 anti-CD4-Per-CP/anti-CD25-PE/anti-CD127-APC (Biolegend 公司) 三色荧光抗体,标记 3 支流式管,分别加入 20 μ l 的同型对照试剂及相对应的荧光抗体,取待测样本 100 μ l 分别加入各管,室温避光孵育 30 min 后加溶血素 (BD 公司) 1.5 ml,静置 10 min,1 500 \times g 离心 5 min,弃上清液,2 ml PBS 洗涤 2 次,加 1% 多聚甲醛 0.5 ml,上流式细胞仪 (FACSAria, 美国 BD 公司) 检测淋巴细胞比例、CD4⁺T 细胞比例、CD8⁺T 细胞比例、CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例、NK 细胞比例。应用 Cell-Quest 软件分析数据。

1.4 患者血常规及血生化检测

患者在接受 GVAX 治疗前 1 d 清晨及疗程结束后抽取空腹静脉血,应用 Sysmex[®] XE-5000 全自动血细胞分析仪进行血常规及血生化相关指标的检测。

1.5 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行分析;原始数据进行正态性检验,结果符合近似正

态分布。治疗前后 T 淋巴细胞亚群比例的变化采用配对 *t* 检验,Treg 比例与临床病理特征的相关性采用独立样本 *t* 检验及 ANOVA 检验,Kaplan-Meier 法检验治疗前后 Treg 比例及治疗前后比例变化对生存的影响。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GVAX 治疗的临床疗效

85 例肺癌患者接受 GVAX 治疗后,除个别患者注射局部出现红斑、硬结、瘙痒、皮疹、低热及短暂流感样症状外,无明显不良反应。85 例肺癌患者总生存时间为 1 ~ 37 个月;病死 39 例,其中早期 (I ~ III A 期) 2 例,晚期 (III B ~ IV 期) 37 例。1、3 年生存率分别为 69.3% 和 48.2%。早、晚期患者中位生存时间分别为 25 个月和 12 个月。Kaplan-Meier 法分析显示,临床分期、有无远处转移、血清 LDH 水平及 GVAX 治疗次数是影响肺癌患者生存的因素 ($P < 0.05$)。

2.2 GVAX 治疗前后患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比例的变化

患者治疗前后外周血各 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比例检测结果 (表 1) 显示,治疗后肺癌患者外周血 Treg 比例下降 [(5.52 \pm 2.68) % vs (4.86 \pm 2.52) % , $P < 0.05$], 但治疗前后患者外周血淋巴细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞的变化无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 GVAX 治疗前后患者外周血 Treg 比例变化及其与肺癌临床病理特征的关系

将肺癌患者治疗前后 Treg 比例与临床病理特征进行相关分析,结果 (表 2、图 1) 显示,治疗前患者外周血 Treg 比例与肺癌临床分期及是否发生远处转移相关,晚期患者较早期患者 Treg 比例明显增高,有远处转移者较未转移者 Treg 比例明显增高 (均 $P < 0.05$)。治疗后 Treg 比例与血清 LDH 水平相关,治疗前 LDH 增高组患者 GVAX 治疗后 Treg 比例明显高于 LDH 正常组 ($P < 0.05$); 与临床分期及是否远处转移无明显相关性 ($P > 0.05$)。治疗前后 Treg 比例的变化与 LDH 及 GVAX 治疗疗程数相关,LDH 增高组治疗后 Treg 比例上升,LDH 正常组治疗后 Treg 比例下降 ($P < 0.05$); 治疗多于 1 个疗程者比治疗 1 个疗程者 Treg 比例下降更明显 ($P < 0.05$)。但是,治疗前后外周血 Treg 比例及其变化与患者性别、年龄、是否吸烟、肺癌组织病理类型、血红蛋白、血小板水平等无关。

表 1 GVAX 治疗前后肺癌患者外周血免疫细胞比例的变化($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Alteration of lymphocyte proportions in peripheral blood of lung cancer patients before and after GVAX therapy

| Time | Lymphocyte | CD4 ⁺ T | CD8 ⁺ T | Treg | NK |
|----------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Before therapy | 19.89 ± 8.93 | 48.47 ± 12.63 | 42.53 ± 12.78 | 5.52 ± 2.68 | 22.13 ± 13.08 |
| After therapy | 20.33 ± 9.25 | 48.72 ± 11.74 | 42.02 ± 12.62 | 4.86 ± 2.52* | 22.00 ± 10.21 |

* P < 0.05 vs before-therapy

表 2 肺癌患者 GVAX 治疗前后外周血 Treg 比例变化与临床病理特征的关系(%)

Tab.2 Correlation between alteration of Treg proportion in peripheral blood of lung cancer patients before and after GVAX therapy and clinicopathological characteristics(%)

| Clinicopathological characteristic | n | Before therapy | | | After therapy | | | Alteration | | |
|------------------------------------|----|----------------|-------|------|---------------|-------|------|---------------|-------|------|
| | | Treg | t | P | Treg | t | P | Treg | t | P |
| Sex | | | | | | | | | | |
| Male | 59 | 5.58 ± 2.72 | 0.29 | 0.77 | 5.09 ± 2.67 | 1.26 | 0.21 | -0.48 ± 2.53 | 1.02 | 0.31 |
| Femal | 26 | 5.39 ± 2.65 | | | 4.34 ± 2.09 | | | -1.05 ± 1.90 | | |
| Age(t/a) | | | | | | | | | | |
| < 65 | 61 | 5.61 ± 2.72 | 0.44 | 0.66 | 4.83 ± 2.63 | -0.19 | 0.85 | -0.77 ± 1.99 | -0.70 | 0.49 |
| ≥ 65 | 24 | 5.32 ± 2.62 | | | 4.94 ± 2.27 | | | -0.37 ± 3.14 | | |
| Karnofsky score | | | | | | | | | | |
| > 80 | 33 | 5.14 ± 2.44 | -1.05 | 0.29 | 4.25 ± 1.99 | -1.83 | 0.07 | -0.89 ± 2.31 | -0.74 | 0.46 |
| ≤ 80 | 52 | 5.77 ± 2.82 | | | 5.25 ± 2.75 | | | -0.51 ± 2.41 | | |
| Smoking status | | | | | | | | | | |
| Yes | 44 | 5.33 ± 2.60 | -0.70 | 0.48 | 4.84 ± 2.31 | -0.08 | 0.94 | -0.48 ± 2.55 | 0.72 | 0.47 |
| No | 41 | 5.74 ± 2.79 | | | 4.89 ± 2.76 | | | -0.85 ± 2.17 | | |
| Pathological type | | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 47 | 5.53 ± 2.75 | 0.02 | 0.97 | 5.07 ± 2.83 | 0.67 | 0.51 | -0.45 ± 2.42 | 1.00 | 0.37 |
| Squamous carcinoma | 28 | 5.58 ± 2.66 | | | 4.41 ± 1.83 | | | -1.16 ± 2.58 | | |
| Small cell carcinoma | 10 | 5.37 ± 2.75 | | | 5.16 ± 2.75 | | | -0.21 ± 0.88 | | |
| Clinical stage | | | | | | | | | | |
| I ~ III A | 23 | 4.53 ± 2.64 | -2.12 | 0.04 | 4.27 ± 2.14 | -1.34 | 0.18 | -0.27 ± 2.10 | 0.93 | 0.36 |
| III ~ B IV | 62 | 5.89 ± 2.63* | | | 5.09 ± 2.62 | | | -0.81 ± 2.45 | | |
| Metastasis status | | | | | | | | | | |
| Yes | 57 | 5.97 ± 2.76 | 2.26 | 0.03 | 5.01 ± 2.66 | 0.77 | 0.45 | -0.96 ± 2.39 | -1.71 | 0.09 |
| No | 28 | 4.60 ± 2.31* | | | 4.56 ± 2.20 | | | -0.04 ± 2.22 | | |
| Hemoglobin | | | | | | | | | | |
| Normal | 72 | 5.49 ± 2.68 | 0.01 | 0.99 | 4.91 ± 2.62 | 0.45 | 0.65 | -0.58 ± 2.37 | 0.48 | 0.63 |
| Abnormal | 13 | 5.48 ± 2.65 | | | 4.50 ± 1.87 | | | -0.98 ± 1.79 | | |
| Platelet | | | | | | | | | | |
| Normal | 64 | 5.63 ± 2.59 | -0.57 | 0.56 | 4.87 ± 2.56 | 0.03 | 0.98 | -0.76 ± 2.28 | 0.70 | 0.49 |
| Abnormal | 21 | 6.53 ± 4.18 | | | 4.83 ± 3.21 | | | -1.70 ± 2.38 | | |
| LDH | | | | | | | | | | |
| Normal | 65 | 5.59 ± 2.76 | 0.41 | 0.68 | 4.50 ± 2.23 | -2.45 | 0.02 | -1.09 ± 2.24 | -3.19 | 0.02 |
| Abnormal | 20 | 5.31 ± 2.48 | | | 6.04 ± 3.07* | | | 0.75 ± 2.27* | | |
| GVAX course | | | | | | | | | | |
| 1 | 72 | 5.33 ± 2.81 | -1.58 | 0.12 | 4.93 ± 2.66 | 0.58 | 0.57 | -0.39 ± 2.39 | 2.48 | 0.02 |
| > 1 | 13 | 6.60 ± 1.52 | | | 4.49 ± 1.53 | | | -2.11 ± 1.62* | | |

* P < 0.05 vs early stage (I ~ III A) or metastasis or LDH normal level or GVAX 1 course

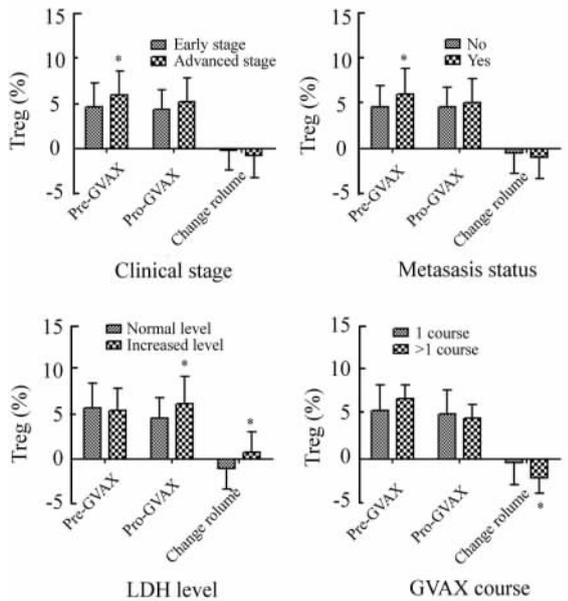


图1 肺癌患者 GVAX 治疗前后的 Treg 比例与临床分期、转移状态、LDH 水平和疗程数有关

Fig.1 The proportion of Treg in lung cancer patients before and after GVAX therapy correlated to clinical stage, metastasis status, LDH level and GVAX cycles

* $P < 0.05$ vs early stage (I ~ III A) or metastasis or normal LDH level or GVAX 1 course

2.4 GVAX 治疗前后外周血 Treg 比例及其变化对肺癌患者预后的影响

GVAX 治疗前患者 Treg 比例均数为 5.52%, 按此值将患者分成两组: $\geq 5.52\%$ 组及 $< 5.52\%$ 组。统计两组患者预后情况, 该两组患者的中位 OS 分别为 17 个月和 15 个月, Kaplan-Meier 分析显示两组 OS 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同样将患者治疗后 Treg 比例按其均值 (4.86%) 分为 $\geq 4.86\%$ 组及 $< 4.86\%$ 组, 该两组患者的中位 OS 分别为 14 个月和 18 个月, Kaplan-Meier 分析显示两组 OS 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

将患者治疗前后 Treg 比例变化按上升(治疗后 Treg 比例增高)与下降(治疗后 Treg 比例降低)分为两组, Treg 比例下降组患者 53 例, 中位 OS 为 21 个月; 上升组患者 32 例, 中位 OS 为 10 个月; 两组 OS 差异具有明显统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。结果提示, 接受 GVAX 治疗后 Treg 比例下降者预后较好。为消除临床分期、病理类型等临床病理特征对该两组 OS 的影响, 对两组患者性别、年龄、吸烟、临床分期、病理类型、是否手术、有无远处转移等临床病理特征的构成进行 χ^2 检验, 结果发现两组的这些临床

病理特征间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

治疗前后患者外周血 Treg 比例的变化对晚期肺癌患者 GVAX 治疗的效果及预后更加有意义。早期患者中 9 例上升、14 例下降; 晚期患者 23 例上升、39 例下降。该 4 组中位 OS 分别为 19 个月、28 个月、8 个月、18 个月。早期患者中 Treg 比例下降组 OS 略长于上升组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。晚期患者中 Treg 比例下降组 OS 明显长于 Treg 比例上升组 ($P < 0.05$), 提示晚期患者接受 GVAX 治疗后 Treg 比例下降者的预后要好于比例上升者(图 3)。该两组患者的性别、年龄、吸烟情况、临床分期、是否手术等临床病理特征间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

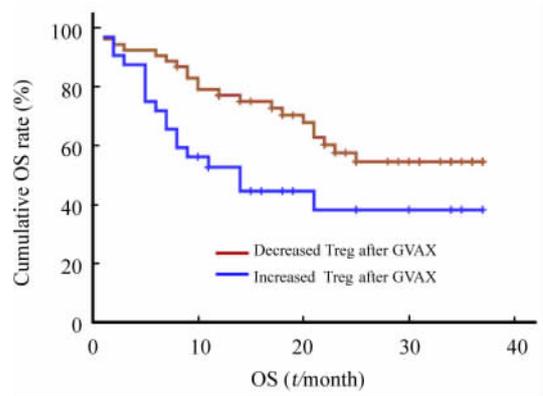


图2 GVAX 治疗前后肺癌患者外周血 Treg 比例不同变化组的中位 OS

Fig.2 Median OS of groups with different Treg change in peripheral blood of lung cancer patients before and after GVAX therapy

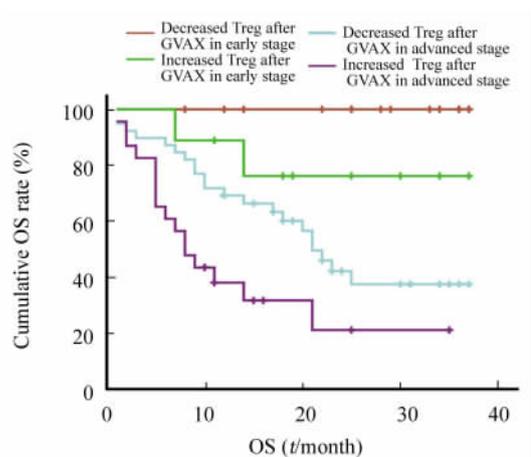


图3 早期和晚期肺癌患者 GVAX 治疗后 Treg 比例变化对患者中位 OS 的影响

Fig.3 Effect of alteration of Treg proportion of lung cancer patients in different tumor stages after GVAX therapy on median OS

3 讨论

GVAX 疫苗是将 *GM-CSF* 基因通过不同的方法(非病毒载体和病毒载体)修饰自体或异体的肿瘤细胞,经射线照射杀死肿瘤细胞后给肿瘤患者进行多次皮下免疫注射,诱发机体产生肿瘤特异性的细胞免疫反应,以达到特异性杀伤肿瘤的目的^[9]。GVAX 在国内外已开展了广泛临床前和临床试验,并已用于前列腺癌^[10]、头颈部肿瘤^[11]、肾脏肿瘤^[12]及黑素瘤^[13]等多种肿瘤患者的治疗,已公认为是一种安全、有效的肿瘤细胞疫苗。GVAX 在肺癌治疗中也有广泛研究。Salgia 等^[3]应用 GVAX 治疗转移性非小细胞肺癌获得了较好疗效,患者无进展生存时间明显延长。Nemunaitis 等^[2]进行的一项 GVAX 治疗早、晚期肺癌的多中心 I/II 期临床研究显示, GVAX 治疗组患者能获得更长的生存。虽然 GVAX 治疗已被证实为有效,但还有一部分患者接受 GVAX 治疗后其预后无明显改善。怎样预测 GVAX 治疗的疗效,目前尚无可以采用的观察指标。

本研究发现,经 GVAX 治疗后,肺癌患者外周血 Treg 细胞比例明显下降, Kaplan-Meier 分析 Treg 下降组患者生存期明显长于上升组,且晚期肺癌患者生存期延长更明显,提示治疗前后 Treg 比例变化可能是预测 GVAX 疗效和预后的重要免疫学指标。

Treg 最早是由 Sakaguchi 等^[14]于 1995 年报道的一组具有免疫调节功能的细胞群,约占 CD4⁺T 细胞的 5%~10%^[15],对维持自身耐受和避免机体过度免疫损伤具有重要作用,同时也参与肿瘤免疫逃逸。Treg 在胃肠道恶性肿瘤^[4]、卵巢癌^[5]、肝癌^[6]、肾癌^[16]、头颈部肿瘤^[17]等患者的外周血及肿瘤浸润淋巴细胞和肿瘤部位引流淋巴结中比例上调。Woo 等^[18]研究证实, Treg 细胞比例增加与肺癌的进展有关,本组资料也显示肺癌患者外周血 Treg 比例与肺癌的进展有关。

多项研究显示,恶性肿瘤患者治疗后外周血及肿瘤局部、转移部位的 Treg 比例下降。Tokuno 等^[4]发现,手术切除后胃癌患者外周血 Treg 比例明显下降,化疗^[19]、靶向药物治疗^[20]也能够降低 Treg 比例,延长患者生存期。本课题前期 GVAX 治疗肾癌及胃肠道恶性肿瘤的临床试验显示,治疗后患者外周血 Treg 比例明显下降^[8]。本研究则发现, 85 例肺癌患者接受 GVAX 治疗后外周血 Treg 比例也明显下降,且 GVAX 疗程数越多, Treg 比例下降越明显,提示 GVAX 治疗可以降低肺癌患者的外周血 Treg 比例,部分纠正机体免疫系统的失调,从而增强机体

抗肿瘤免疫效应,有利于患者的生存。外周血 Treg 比例的变化可能是机体免疫系统对 GVAX 治疗的敏感性的反映,从而可预测 GVAX 治疗后肺癌患者的预后。Chen 等^[20]还发现,伊马替尼能够降低 CD8⁺T 细胞数量。本研究未发现 GVAX 治疗前后 CD8⁺T 细胞数量的改变以及 CD4⁺、NK 等细胞亚群的变化。

本研究还发现, GVAX 治疗前后患者外周血 Treg 比例的变化与其血清 LDH 水平相关, LDH 正常患者治疗后外周血 Treg 比例较 LDH 增高者下降明显,预后较好。这种相关性可能与肿瘤局部缺氧环境有关,缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)表达升高,导致 COX-2^[21]、VEGF^[22]、LDH^[23]表达升高,前两者均可上调 Treg 细胞的数量^[24-25]。LDH 是否上调 Treg 的数量还未见报道。该上调作用有可能 LDH 与 Treg 并无直接联系,只因 LDH 与 VEGF、COX-2 均与缺氧有关,导致 LDH 与 Treg 比例呈现相关性;或者 LDH 通过未知的某种机制上调了 Treg 的数量。

GVAX 治疗可以延长肺癌患者生存期,其毒性作用患者可以耐受,是一种有良好前景的生物治疗措施。GVAX 治疗可以降低肺癌患者外周血 Treg 的比例,部分纠正机体免疫功能的失调,从而增强机体抗肿瘤免疫效应,延长患者的生存。治疗前后 Treg 比例的变化有可能成为评价 GVAX 治疗肺癌患者的疗效及预测生存期的免疫指标。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Nemunaitis J, Sterman D, Jablons D, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small cell lung cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(4): 326-331.
- [3] Salgia R, Lynch T, Skarin A, et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(4): 624-630.
- [4] Tokuno K, Hazama S, Yoshino S, et al. Increased prevalence of regulatory T-cell in the peripheral blood of patients with gastrointestinal cancer [J]. Anticancer Res, 2009, 29(5): 1527-1532.
- [5] Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(51): 18538-18543.
- [6] Shen X, Li N, Li H, et al. Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM

- stage of hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(11): 1745-1754.
- [7] Okita R, Saeki T, Takashima S, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep, 2005, 14(5): 1269-1273.
- [8] 康红刚, 王运良, 于津浦, 等. GM-CSF 修饰的异体肿瘤细胞疫苗治疗晚期肿瘤的 I 期临床试验 [J]. 中国医药生物技术, 2008, 3(6): 420-424.
- [9] Eager R, Nemunaitis J. GM-CSF gene-transduced tumor vaccines [J]. Mol Ther, 2005, 12(1): 18-27.
- [10] Rini BI, Weinberg V, Bok R, et al. Prostate-specific antigen kinetics as a measure of the biologic effect of granulocyte-macrophage colon-stimulating factor in patients with serologic progression of prostate cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(1): 99-105.
- [11] Couch M, Saunders JK, O'Malley BW Jr, et al. Genetically engineered tumor cell vaccine in a head and neck cancer model [J]. Laryngoscope, 2003, 113(3): 552-556.
- [12] Tani K, Azuma M, Nakazaki Y, et al. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: Clinical and immunological findings [J]. Mol Ther, 2004, 10(4): 799-816.
- [13] Luiten RM, Kueter EW, Mooi W, et al. Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(35): 8978-8991.
- [14] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [15] Maggi E, Cosmi L, Liotta F, et al. Thymic regulatory T cells [J]. Autoimmun Rev, 2005, 4(8): 579-586.
- [16] Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, et al. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4⁺CD25⁺ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7): 2075-2081.
- [17] Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(1/2): 426-433.
- [18] Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory T CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(12): 4766-4672.
- [19] Ersvaer E, Liseth K, Skavland J, et al. Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREG cells [J]. BMC Immunol, 2010, 7(9): 11-38.
- [20] Chen J, Schmitt A, Giannopoulos K, et al. Imatinib impairs the proliferation and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in a dose-dependent manner [J]. Int J Oncol, 2007, 31(5): 1133-1139.
- [21] Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, et al. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(3): 804-817.
- [22] Lee JJ, Natsuizaka M, Ohashi S, et al. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 427-434.
- [23] Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements [J]. J Biol Chem, 1995, 270(36): 21021-21027.
- [24] Sharma S, Yang SC, Zhu L, et al. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5211-5220.
- [25] Long M, Park SG, Strickland I, et al. Nuclear factor-kappa B modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor [J]. Immunity, 2009, 31(6): 921-931.
- [收稿日期] 2011-08-15 [修回日期] 2011-09-10
[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH用正体除外),例如*m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成mg/kg/d的形式,应写成mg/(kg·d)或mg·kg⁻¹·d⁻¹的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号A°(埃)已不用,应写作0.1nm;时间单位“小时”符号为h(不是hr)、“秒”符号为s(不是sec);转速单位符号为r/min(不是rpm);量浓度单位符号为mol/L(不是M、N,也不是mol/mm³);力的单位“牛顿”符号为N(不是dyn(达因)、kgf(千克力),换算1dyn=10⁻⁵N);热量单位“焦耳”符号为J(不是cal(卡)、kcal(千卡),换算1cal=4.187J);放射性活度单位符号为Bq(不是Ci(居里),换算1Ci=3.7×10¹⁰Bq)。

(本刊编辑部)