

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.013

## 多肽负载 DC 联合 CIK 治疗激素难治性前列腺癌的疗效

章焯<sup>1</sup>, 朱寿兴<sup>1</sup>, 申小苏<sup>1</sup>, 朱为民<sup>1</sup>, 马素娟<sup>2</sup>, 时宏珍<sup>2</sup>, 史央<sup>2</sup>, 朱晨瑶<sup>2</sup>, 李蔚<sup>1</sup> (1. 无锡市第四人民医院 中西医结合科, 江苏 无锡 214062; 2. 南京得康生物技术有限公司, 江苏 南京 210019)

**[摘要]** **目的:** 研究多肽负载树突状细胞(dendritic cell, DC)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)对激素难治性前列腺癌(hormone refractory metastatic prostate cancer, HRPC)患者免疫治疗的效果。**方法:** 选择无锡市第四人民医院中西医结合科收治的 HLA-A2<sup>+</sup> HRPC 患者 26 例, 分离外周血单个核细胞, 其中贴壁细胞经 GM-CSF、IL-4 联合诱导培养为成熟 DC, 负载前列腺癌特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)、前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase, PAP)、前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)三个多肽, 制备成 DC 疫苗, 经患者腹股沟皮内注射; 未贴壁细胞经 IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗 CD3 单抗、IL-1 体外诱导培养成 CIK, 经静脉回输给患者。在治疗后 1 周进行迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)检测, 在患者治疗前后进行血清中细胞因子和 PSA 检测, 治疗结束后 4 周进行短期疗效评价。**结果:** 26 例 HRPC 患者对 DC 联合 CIK 治疗的耐受良好。治疗后患者血清中 IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  水平较治疗前显著升高(上升幅度分别为 65.07%、67.69% 和 125.38%,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平变化不大; DTH 的阳性率为 43.5% (10/23); 7 例患者的 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞比例较治疗前显著提高[(8.95  $\pm$  2.74)% vs (0.39  $\pm$  0.15)%,  $P < 0.01$ ]; 8/26 例患者的 PSA 下降, 降幅为 13% ~ 66%。26 例患者短期疗效评价, 3 例 PR、4 例 PD、19 例 SD, 所有患者治疗中未出现明显不良反应。**结论:** 多肽负载 DC 联合 CIK 治疗 HRPC 能激发患者的免疫应答、诱导 Th1 型细胞因子的分泌, 近期疗效良好, 是一种安全的治疗方法。

**[关键词]** 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 激素难治性前列腺癌; PSA; PAP; PSMA

**[中图分类号]** R737.25, R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)04-0414-07

## Efficacy of polypeptide-loaded dendritic cells in combination with cytokine-induced killer cells on hormone refractory prostate cancer

ZHANG Ye<sup>1</sup>, ZHU Shou-xing<sup>1</sup>, SHEN Xiao-su<sup>1</sup>, ZHU Wei-min<sup>1</sup>, MA Su-juan<sup>2</sup>, SHI Hong-zhen<sup>2</sup>, SHI Yang<sup>2</sup>, ZHU Chen-yao<sup>2</sup>, LI Wei<sup>1</sup> (1. Department of Chinese Traditional and Western Medicine, Wuxi No. 4 People's Hospital, Wuxi 214062, Jiangsu, China; 2. Nanjing Decon Bio-Technology Co., LTD, Nanjing 210019, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the efficacy of polypeptide-loaded dendritic cells (DCs) in combination with cytokine-induced killer cells (CIKs) against hormone refractory metastatic prostate cancer (HRPC) patients. **Methods:** Twenty-six HLA-A2<sup>+</sup> patients with HRPC were enrolled from the Department of Chinese Traditional and Western Medicine of the Wuxi No. 4 People's Hospital. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated, and the adherent cells were induced into DCs by GM-CSF and IL-4. Then DCs were loaded with three peptides (prostate specific antigen, PSA; prostatic acid phosphatase, PAP; prostate specific membrane antigen, PSMA) to prepare DC vaccine and were injected intracutaneously. The un-adherent cells of PBMCs were induced into CIK by IFN- $\gamma$ , IL-2, CD3 monoclonal antibody and IL-1, and were injected intravenously. Delayed type hypersensitivity (DTH) was detected one week after treatment, and cytokine and PSA in serum were determined before and after treatment. The short-term efficacy was evaluated 4 weeks after treatment. **Results:** DC-CIK therapy was well tolerated in 26 HRPC patients. The serum IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$  levels after therapy were significantly increased (increased 65.07%, 67.69% and 125.38%,  $P < 0.05$  or  $P <$

**[基金项目]** 无锡市科技局指导性计划项目资助。Project supported by the Scientific Guidance Plan of Science and Technology Bureau of Wuxi.

**[作者简介]** 章焯(1976-),男,江苏省无锡市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤的综合治疗研究。E-mail: snowwolf9988@sina.com

**[通信作者]** 李蔚(LI Wei, corresponding author), E-mail: wsleewei@yahoo.cn

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1044.001.html>

0.01), while TNF- $\alpha$  and IL-10 levels were unchanged. The positive rate of DTH was 43.5% (10/23). The proportion of CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells after therapy was significantly increased ([8.95  $\pm$  2.74]% vs [0.39  $\pm$  0.15]%,  $P < 0.01$ ). A decrease of PSA (13% to 66%) was observed in 8 of 26 patients. The short-term efficacy of 26 HRPC patients was evaluated, with 3 PR, 4 PD, and 19 SD after treatment, and no severe adverse reaction was observed. **Conclusion:** The poly-peptide-loaded DC in combination with CIK therapy can elicit specific immune responses in HRPC patients, and induce type I cytokine secretion with well short-term clinical efficacy, indicating that DC-CIK therapy is a safe treatment for HRPC.

[ **Key words** ] dendritic cell; cytokine-induced killer cell; hormone refractory metastatic prostate cancer; PSA; PAP; PSMA

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 414-420 ]

前列腺癌在欧美发病率位居全部肿瘤中的第一位,病死率居第二位,仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。我国前列腺癌的发病率呈明显上升趋势<sup>[2]</sup>。手术切除局部病灶并辅以放疗、化疗及激素疗法是目前治疗早期前列腺癌的标准方法,但有近 20% 的患者病情不能得到有效控制并发生转移。约 1/3 患者就诊时肿瘤已进入晚期或已转移,对转移患者,采用激素撤退疗法( androgen deprivation )能使 80% 左右的患者病情得到控制或缓解,但几乎所有患者最后均进入激素难治性前列腺癌( hormone refractory metastatic prostate cancer, HRPC )阶段,此类患者( D2 期)平均生存期仅约 6 个月<sup>[3]</sup>。生物免疫治疗对前列腺癌有很好的疗效,其中大多是基于树突状细胞( dendritic cell, DC )疫苗的疗效<sup>[4-9]</sup>。

DC 是抗原提呈功能最强的 APC。DC 将摄取的抗原提呈给 T 细胞,诱导静息 T 细胞活化为细胞毒性 T 细胞( cytotoxic T lymphocyte, CTL ),引起 T 细胞介导的免疫应答,从而产生抗肿瘤效应。体外从外周造血祖细胞诱导扩增 DC 为肿瘤免疫治疗开辟了新方向。负载抗原的 DC 作为肿瘤疫苗,对黑色素瘤、B 细胞淋巴瘤、前列腺癌等患者均有一定的疗效<sup>[10-12]</sup>。

细胞因子诱导的杀伤细胞( cytokine-induced killer cell, CIK )是外周血单个核细胞在体外多种细胞因子刺激后获得的一群异质细胞,具有 T 细胞的抗肿瘤活性和自然杀伤细胞( natural killer, NK )的非 MHC 限制性杀瘤活性。DC 联合 CIK,前者识别抗原、激活获得性免疫系统,后者通过自身细胞毒性和分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。DC-CIK 治疗恶性肿瘤,有助于激活肿瘤患者 T 细胞的免疫功能,起到抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>。

前列腺癌存在肿瘤特异性及相关性抗原,被认为是适于应用免疫疗法的肿瘤类型。本研究

采用前列腺癌特异性抗原( prostate specific antigen, PSA )、前列腺酸性磷酸酶( prostatic acid phosphatase, PAP )、前列腺特异性膜抗原( prostate specific membrane antigen, PSMA )三种多肽混合负载 DC,同时联合 CIK 对 26 例 HRPC 患者进行免疫治疗,并对其安全性、免疫反应性与近期临床疗效进行综合评价,为细胞免疫治疗在 HRPC 中的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例选择

选取无锡市第四人民医院中西医结合科 26 例 HLA-A2<sup>+</sup> 的 HRPC 患者(表 1),患者中位年龄为 69.0 岁(57 ~ 79 岁),其中 21 例进行过去势治疗、6 例进行过激素治疗;Karnofsky 评分在 70 分以上,患者造血功能及心、肝、脑、肾等重要器官功能正常,无自身免疫疾病,预计生存期超过 6 个月。DC 联合 CIK 免疫治疗的方法和程序经本院伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

### 1.2 主要材料

RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,人重组 GM-CSF、IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗 CD3 单抗( mAb )与 IL-1 均购自 R&D 公司,AB 血清购自江苏省红十字血站,淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司。FITC 标记的小鼠抗人 HLA-A2、PE 标记的小鼠抗人 CD80、PE 标记的小鼠抗人 CD83、PE 标记的小鼠抗人 CD86、PerCP 标记的小鼠抗人 HLA-DR、APC 标记的小鼠抗人 CD11c、PE 标记的小鼠抗人 CD14、FITC 标记的小鼠抗人 CD3、PE 标记的小鼠抗人 CD4、PerCP 标记的小鼠抗人 CD8、APC 标记的小鼠抗人 CD56 mAb 均购自 BD 公司。内毒素检测试剂盒购自湛江安度斯生物有限公司。

表1 HRPC 患者基本信息  
Tab.1 Basic information of HRPC patients

No.	Age	Stage	Metastasis	Previous therapy
1	76	III	None	Gonadectomy
2	65	III	None	Gonadectomy
3	57	III	None	Gonadectomy and hormone
4	62	III	None	Gonadectomy and hormone
5	75	III	None	Gonadectomy
6	72	III	None	Gonadectomy
7	70	IV	Bone, liver	Gonadectomy, chemotherapy and TAIT
8	71	IV	Bone	Gonadectomy
9	64	IV	Bone	TVP and PVP
10	66	IV	Bone	Gonadectomy, chemotherapy and radiotherapy
11	75	IV	Bone	Gonadectomy, chemotherapy and hormone
12	69	IV	Bone	Gonadectomy, chemotherapy and radiotherapy
13	70	IV	Bone	TVP and radiotherapy
14	63	IV	Bone	Gonadectomy
15	65	IV	Bone	Chemotherapy and radiotherapy
16	63	IV	Bone	Gonadectomy, chemotherapy and hormone
17	70	IV	Bone	Gonadectomy
18	69	IV	Bone	Gonadectomy, chemotherapy and radiotherapy
19	70	IV	Lung, bone	Gonadectomy and radiotherapy
20	72	IV	Bone	TVP, Gonadectomy and radiotherapy
21	72	IV	Bone	Gonadectomy and hormone
22	70	IV	Bone	Gonadectomy and hormone
23	72	IV	Bone	TVP and radiotherapy
24	71	IV	Bone	Gonadectomy
25	79	IV	Bone	Gonadectomy
26	67	IV	Bone	Gonadectomy

PSA 多肽序列为:KLQCVLHV;PAP 多肽序列为:ALDVYNGLL;PSMA 多肽序列为:LLHETDSA;由上海吉尔生化有限公司合成,均为 HLA-A2 限制性多肽,纯度为 95% 以上。多肽用无热原水溶解,10 mg/ml,分装后 -80℃ 贮存。

1.3 DC 的体外培养及多肽负载

所有参加治疗的患者先进行造血动员,造血动员方案为:GM-CSF 75 μg,每天 2 次,动态检测外周血细胞,当淋巴细胞和单核细胞之和达到 2 × 10<sup>9</sup>/L 时,采抗凝外周血 100 ~ 150 ml。Ficoll 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC),收集细胞,按 2 × 10<sup>6</sup> ~ 3 × 10<sup>6</sup>/ml 重悬于 RPMI 1640 培养基中,37 °C 孵育 90 min,洗去未贴壁细胞,加入含 100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4、10% AB 血清的 RPMI 1640 培养基,培养第 3 天进行 1/3 换液,同时补充细胞因子。第 5 天收获未成熟 DC,用 10% AB 血清的 RPMI 1640 培养基重悬,调整密度为 1 × 10<sup>6</sup>/ml,加入终质量密度为 10 ng/ml IL-1β、20 ng/ml IL-6、0.5 μg/ml PGE-2、10 ng/ml TNF-α,诱导培养 24 h。按文献[15]方法进行标记,以流式术检验 DC 表型,用 Cell Quest 软件进行分析。

收获成熟 DC 后,加入 PSA (终质量浓度 10 μg/ml)、PAP(终质量浓度 10 μg/ml)、PSMA(终质量浓度 10 μg/ml)多肽,共育 4 h 后用生理盐水洗涤 3 次。将 DC 重悬于 2 ml 生理盐水中,灌装后 4 °C 下运输至临床进行注射。留取部分 DC 悬液作锥虫蓝染色与计数;按《中华人民共和国药典》(2005 版)第三部规定的方法进行内毒素和无菌检测,内毒素 ≤ 5 EU/ml 判定为合格,培养观察至 14 d 无菌生长判定为无菌合格。

1.4 CIK 的体外培养

外周血单个核细胞贴壁培养后收获未贴壁细胞,重悬于含 10% AB 血清 RPMI 1640 培养液中,调整细胞密度至 2.5 × 10<sup>6</sup>/ml,铺入预先包被有 anti-CD3 mAb 的培养瓶,添加 IFN-γ(终质量浓度 1 000 U/ml),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,第 2 天添加 IL-1α(终活性浓度 10 ng/ml)、IL-2(终活性浓度 250 U/ml),继续培养;第 3 天用含 10% AB 血清 RPMI 1640 培养液进行补液,此后根据细胞状态适当补液等。按文献[15]进行细胞标记与检测,流式术检测 CIK 表型,以 Cell Quest 软件进行分析。并对 CIK 进行内毒素和无菌检测。

1.5 DC 联合 CIK 治疗方案

1.5.1 DC 注射方案 DC 注射前、中与后观察患者生命体征;采用 18G 贝朗浅静脉留置针(配 BD 血气注射器)在近腹股沟大腿内侧进行皮内注射,每侧注射 1 ml DC 细胞悬液;每周注射 1 次,剂量为 (4.0 ± 0.5) × 10<sup>6</sup> 细胞/次,共注射 2 次。注射结束后留观 45min,一切正常后患者方可离开。

1.5.2 CIK 回输方案 每次治疗前 24 h 对 CIK 进行内毒素等检测,检测均合格后,于培养的第 7 ~ 11

天收集 CIK 细胞,离心,生理盐水洗涤 3 次,用含有 10% 患者自身血浆的生理盐水重悬,总体积为 100 ml,2 h 内经静脉回输患者,每次回输细胞数约为  $(5.0 \pm 0.5) \times 10^8$  细胞/次,共滴注 5 次。滴注结束后留观 45 min,一切正常后患者方可离开。

在每次 DC 或 CIK 细胞回输 24 h 内,观察患者是否出现全身过敏反应,如有过敏反应及时作对症处理<sup>[16]</sup>。DC 联合 CIK 治疗的每个疗程之间间隔 1 个月。

### 1.6 DC 联合 CIK 治疗的免疫反应检测

1.6.1 细胞因子水平检测 免疫治疗前、治疗后 1 周抽取患者外周血 5 ml,收集血清后保存于超低温冰箱中。检测项目为 IL-2、IL-10、IL-12、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ,按照检测试剂盒说明书进行操作。

1.6.2 抗原特异性 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞检测 按文献<sup>[17]</sup>描述方法进行,采用胞内染色试剂盒(美国 BD 公司)检测。具体如下:采集 DC 免疫治疗前和结束后 1 周患者外周抗凝血 10 ml,Ficoll 密度梯度离心分离获取 PBMC,用负载多肽 DC 分别刺激 PBMC 4 d,最后 5 h 添加蛋白转运抑制剂 BFA 至终质量浓度 10  $\mu$ g/ml;收获并洗涤细胞,CD8-Percep 标记 20 min,4% 多聚甲醛固定 15 min,用破膜剂处理细胞 10 min,再进行 IFN- $\gamma$ -FITC 标记,洗涤后进行流式细胞仪检测。

1.6.3 DTH 试验 DC 免疫治疗结束后 5~7 d 进行 DTH 检测,准备 0.2 ml 多肽负载的 DC 细胞悬液,用 1 ml 结核菌素注射器(18G 针头)于前臂内侧

皮内注射,做好相应标记,于对侧前臂内侧皮内注射 0.2 ml 生理盐水作为对照。注射后 48~72 h 内观察注射部位有无红肿结节,并测量结节直径大小,直径大于 5.0 mm 者判断为 DTH 试验阳性。

1.6.4 肿瘤标志物检测 分别于治疗前及全部治疗结束后 1 个月采集患者外周血,采用化学发光法检测 PSA 水平,试剂为瑞士罗氏公司产品。

### 1.7 DC 联合 CIK 治疗的临床疗效评价

评估患者的临床疗效,包括肿瘤标志物 PSA 水平、原发灶与转移灶变化等客观指标。治疗后 1 个月进行随访。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DC 的表型

对培养过程中的 mDC 的表面标志物进行流式标记及检测,结果(表 2)显示,成熟 DC 与未成熟 DC 比较,CD80<sup>+</sup> 细胞、CD83<sup>+</sup> 细胞和 CD86<sup>+</sup> 细胞比例显著上升,呈现典型成熟 DC 表型。

### 2.2 CIK 的表型

对培养获得的 CIK 表面标志物进行流式标记及检测,结果(表 3)显示,CIK 细胞的表型均在理论值范围中,说明 CIK 细胞符合质量要求。

表 2 未成熟 DC 及成熟 DC 的表型分析(%)

Tab.2 Phenotype of immature ( im ) and mature ( m )DC ( % )

Phenotype	CD11c <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
imDC	86.35 $\pm$ 5.07	89.51 $\pm$ 4.75	2.99 $\pm$ 0.91	6.52 $\pm$ 1.12	8.69 $\pm$ 1.98
mDC	90.56 $\pm$ 5.74	91.42 $\pm$ 5.41	59.65 $\pm$ 9.74	54.21 $\pm$ 6.64	94.21 $\pm$ 3.12

表 3 CIK 的表型分析(%)

Tab.3 Phenotype of CIK( % )

Phenotype	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>
CIK	93.23 $\pm$ 2.98	85.13 $\pm$ 4.98	22.65 $\pm$ 1.32	46.77 $\pm$ 5.64	7.87 $\pm$ 2.08

### 2.3 HRPC 患者治疗前后细胞因子水平的变化

HRPC 患者治疗前后 IL-2、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平变化见表 4。DC 联合 CIK 治疗后患者血清 IL-2、IL-12 和 IFN- $\gamma$  水平较治疗前显著提高

( $P < 0.05$ ),提高的幅度分别为 65.07%、67.69% 和 125.38%;其中以 IFN- $\gamma$  水平升高最为显著。TNF- $\alpha$  水平虽有提高,但幅度较小。IL-10 水平治疗前后无明显变化。

表4 DC联合CIK治疗前后HRPC患者血清细胞因子水平的变化( $n=26, \bar{x} \pm s, \rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Tab. 4 Changes of serum cytokine levels in HRPC patients before and after DC-CIK therapy ( $n=26, \bar{x} \pm s, \rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Cytokine	Before therapy	After therapy	Rate of rise (%)
IL-2	35.5 ± 5.9	58.6 ± 7.4*	65.07
IL-10	12.4 ± 3.4	10.9 ± 1.9	-12.10
IL-12	52.3 ± 4.8	87.7 ± 10.4*	67.69
IFN-γ	65.4 ± 8.7	147.4 ± 16.5**	125.38
TNF-α	46.5 ± 6.7	53.3 ± 4.9	14.62

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs before therapy

2.4 HRPC患者治疗前后抗原特异性IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞的变化

26例HRPC患者中有16例在DC免疫治疗后进行了外周血IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞的检测,其中在7例HRPC患者中检测到了特异性的IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞,治疗前IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例平均为(0.39 ± 0.15)%,治疗后平均为(8.95 ± 2.74)%。图1为2号HRPC患者的检测结果。

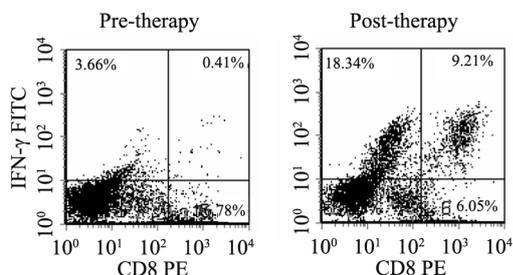


图1 2号HRPC患者DC联合CIK治疗前后IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞的比例

Fig.1 Percentage of IFN-γ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in No.2 patient before and after DC-CIK therapy

2.5 DC联合CIK治疗后患者的DTH试验结果

本组中23例患者进行了DTH检测,其中10例患者DTH检测结果为阳性,阳性率为43.5%。

2.6 患者DC联合CIK治疗的短期疗效评价

患者在治疗前后进行了PSA的检测,其中8例患者PSA下降,平均下降29%(13%~66%);6例患者PSA上升;12例保持稳定。26例患者DC联合CIK治疗后4周进行短期疗效评价,结果(表5)显示,3例PR,4例PD,19例SD。

2.7 DC联合CIK治疗的不良反应

患者每次回输后30min及整个治疗过程未出现恶心、寒战和发热等不良症状。对DC或CIK细

胞回输前后的造血、肝、肾功能检测结果显示,该治疗对肝、肾功能无明显影响。有2例患者腰部轻微酸痛,22例患者的睡眠、食欲、精神、体力较治疗前明显改善。结果提示,细胞免疫治疗是安全的,无明显毒性作用。

3 讨论

前列腺癌是严重危害男性健康的疾病,对转移患者,采用激素撤退疗法能使80%左右患者病情得到控制或缓解。但最后进入激素难治性恶化阶段的前列腺癌患者对激素治疗不再敏感。传统放化疗的缺点十分明显,放化疗药物杀灭肿瘤细胞并无特异性,过度化疗反而缩短患者的存活期。且传统放化疗不能杀灭体内所有的肿瘤细胞,导致肿瘤复发、转移。而DC疫苗的应用将能明显提高和改善HRPC患者的预后。2010年4月29日美国FDA批准了首个治疗前列腺癌的DC疫苗(provenge)上市<sup>[18-19]</sup>。

本研究结果表明,负载PSA、PAP和PSMA混合多肽的DC联合CIK治疗是安全的,26例患者均未出现明显不良反应。血清细胞因子检测显示,Th1类细胞因子(IL-2、IL-12、IFN-γ)水平明显升高。Th1类细胞因子在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用,如IL-2、IL-12刺激NK细胞或CTL的杀伤活性,IFN-γ具有较强的抗肿瘤和免疫调节作用等。研究<sup>[20]</sup>发现,细胞免疫治疗后,肿瘤患者中Th1类细胞因子IFN-γ的量与患者疾病进展时间和总生存期呈正相关。另有文献<sup>[21]</sup>报道,DC免疫治疗后,DTH阳性和特异性T细胞与患者的生存期有一定的相关性。在本研究中,43.5%(10/23)患者DTH检测为阳性,表明DC能有效诱导细胞免疫;7例患者治疗后CD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>T细胞克隆数量也明显上调,表明DC免疫治疗确实能激发患者特异性免疫应答。

表 5 DC 联合 CIK 治疗后 HRPC 患者近期临床疗效的评估  
Tab. 5 Short-term clinical responses of HRPC patients after DC-CIK therapy

No.	Immunological scheme	Adverse event	DTH test	PSA( $\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )		Clinical evaluation
				Pre-therapy	Post-therapy	
1	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	1.44	1.52	SD
2	(2DC + 5CIK) × 3	None	Positive	106.21	36.11	PR
3	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	0.46	0.42	SD
4	(2DC + 5CIK) × 3	None	Positive	78.52	45.54	SD
5	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	<0.003	<0.003	SD
6	(2DC + 5CIK) × 2	None	Positive	42.77	51.75	SD
7	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	73.24	65.18	SD
8	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	0.72	0.81	SD
9	(2DC + 5CIK) × 1	None	NT	<0.003	<0.003	SD
10	(2DC + 5CIK) × 2	None	Negative	54.00	93.96	PD
11	(2DC + 5CIK) × 2	None	Positive	<0.003	<0.003	SD
12	(2DC + 5CIK) × 1	None	NT	68.34	61.51	SD
13	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	8.72	21.10	PD
14	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	124.59	84.72	PR
15	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	0.67	0.54	SD
16	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	1.21	1.17	SD
17	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	116.36	176.87	PD
18	(4DC + 5CIK) × 1	None	Negative	89.10	76.63	SD
19	(4DC + 5CIK) × 1	Waist ache	NT	23.10	41.12	PD
20	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	61.57	28.32	PR
21	(2DC + 5CIK) × 3	None	Negative	2.54	2.51	SD
22	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	28.77	35.10	SD
23	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	0.50	0.46	SD
24	(2DC + 5CIK) × 1	None	Positive	45.72	42.98	SD
25	(2DC + 5CIK) × 1	Waist ache	Negative	0.59	0.63	SD
26	(2DC + 5CIK) × 1	None	Negative	<0.003	<0.003	SD

NT: Not test; PR: Partial remission; PD: Progressive disease; SD: Stable disease

研究<sup>[22]</sup>发现,前列腺癌组织中 DC 占白细胞总数的 10% 左右,采用 CD83 和 CMFR44 单克隆抗体标记 DC,发现 CD83<sup>+</sup> 和 CMFR44<sup>+</sup> 激活状态的 DC 小于白细胞总数的 1%,且这些 DC 激活 CTL 的能力较弱。实验研究<sup>[23]</sup>显示,前列腺癌细胞不仅可以杀灭成熟 DC,还抑制 DC 的分化、增殖与成熟,从而减少 DC 数目,并抑制其激发特异性免疫反应的功

能,这可能与前列腺肿瘤细胞释放 VEGF、TNF- $\beta$  等细胞因子有关。DC 数量下降及功能障碍可能是前列腺癌细胞逃逸免疫监视的重要原因。因此,体外激活 DC,回输患者,调动并增强机体抗肿瘤免疫能力是治疗前列腺癌的有效方法之一。同时,本研究还观察了 DC 联合 CIK 治疗后患者肿瘤标志物 PSA 水平的变化,结果显示,8 例患者 PSA 下降,其中 3

例患者下降超过 30%, 达到 PR; 12 例患者 SD。体现了 DC 联合 CIK 治疗有良好的近期临床疗效。总之, PSA、PAP 和 PSMA 混合多肽负载的 DC 联合 CIK 治疗是安全的, 且在体内能激发特异性 T 细胞应答, 显现了一定的近期临床疗效, 但其长期临床疗效还需扩大样本数量作进一步研究。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 [ J ]. *Ann Oncol*, 2007, 18 ( 3 ): 581-592.
- [ 2 ] 王国民, 陈伟. 前列腺癌与肿瘤干细胞研究的意义及前景 [ J ]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24( 10 ): 1162-1163.
- [ 3 ] Rini BI, Small EJ. The potential for prostate cancer immunotherapy [ J ]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 27( 46 ): S117- S125.
- [ 4 ] Amato RJ, Drury N, Naylor S, et al. Vaccination of prostate cancer patients with modified vaccinia ankara delivering the tumor antigen5T4 ( TroVax ): A phase II trial [ J ]. *J Immunother*, 2008, 31( 6 ): 577-585.
- [ 5 ] Acres B. Cancer immunotherapy: Phase II clinical studies with TG4010 ( MVA-MUC1-IL2 ) [ J ]. *J BUON*, 2007, 12( Suppl 1 ): S71-S75.
- [ 6 ] Lehrfeld TJ, Lee DI. Dendritic cell vaccines for the treatment of prostate cancer [ J ]. *Urol Oncol*, 2008, 26( 6 ): 576-580.
- [ 7 ] Mahadevan M, Liu Y, You C, et al. Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56( 10 ): 1615-1624.
- [ 8 ] Mukhopadhyaya A, Mendecki J, Dong X, et al. Localized hyperthermia combined with intratumoral dendritic cells induces systemic antitumor immunity [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 16 ): 7798-7806.
- [ 9 ] Matera L. The choice of the antigen in the dendritic cell-based vaccine therapy for prostate cancer [ J ]. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36( 2 ): 131-141.
- [ 10 ] Mossoba ME, Medin JA. Cancer immunotherapy using virally transduced dendritic cells: Animal studies and human clinical trails [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2006, 5( 5 ): 717-732.
- [ 11 ] Perambakam S, Hallmeyer S, Reddy S, et al. Induction of specific T cell immunity in patients with prostate cancer by vaccination with PSA 146-154 peptide [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55( 9 ): 1033-1042.
- [ 12 ] Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T ( APC8015 ) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2006, 24( 19 ): 3089-3094.
- [ 13 ] 张倩倩, 李锦毅. DC 与 CIK 抗肿瘤研究进展 [ J ]. *中国实用医药*, 2008, 3( 9 ): 128-129.
- [ 14 ] 隋承光, 孟凡东, 王晓华, 等. CIK 细胞的制作及对不同肿瘤细胞株体外抗肿瘤作用的研究 [ J ]. *中国医科大学学报*, 2005, 34( 3 ): 210-211.
- [ 15 ] Shi H, Cao T, Connolly JE, et al. Hyperthermia enhance CTL cross-priming [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 4 ): 2134-2141.
- [ 16 ] Perez-Diez A, Butterfield LH, Li L, et al. Generation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell response to genetically engineered to express Mart-1/Melan A gene [ J ]. *Cancer Res*, 1998, 58( 23 ): 5305-5309.
- [ 17 ] Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54( 3 ): 187-207.
- [ 18 ] Maluf FC, Smaletz O, Herchenhorn D. Castration-resistant prostate cancer: Systemic therapy in 2012 [ J ]. *Clinics*, 2012, 67( 4 ): 389-394.
- [ 19 ] 唐晓义, 张斌, 陈虎. 美国 FDA 批准的首个自体细胞免疫治疗药物 sipuleucel-T 的转化之旅 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18( 6 ): 672-677.
- [ 20 ] Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 14 ): 5955-5964.
- [ 21 ] López MN, Pereda C, Segal G, et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells [ J ]. *Clin Oncol*, 2009, 27( 6 ): 945-952.
- [ 22 ] Troy A, Davidson P, Atkinson C, et al. Phenotypic characterization of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer [ J ]. *J Urol*, 1998, 160( 1 ): 214-219.
- [ 23 ] Aalamian M, Pirtskhalashvili G, Nunez A, et al. Human prostate cancer regulates generation and maturation of monocyte derived dendritic cells [ J ]. *Prostate*, 2001, 46( 1 ): 68-75.

[ 收稿日期 ] 2012-04-13 [ 修回日期 ] 2012-05-26

[ 本文编辑 ] 王莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅