

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.0014

· 临床研究 ·

放疗联合自身免疫细胞治疗宫颈癌的临床疗效

朱月华¹, 刘军权², 曹卉¹, 陈惠萍¹, 陈复兴², 陈玲², 张颂², 吕小婷²(1. 中国人民解放军第97医院妇产科, 江苏徐州 221004; 2. 中国人民解放军第97医院生物治疗中心, 江苏徐州 221004)

[摘要] **目的:** 比较自身免疫细胞联合放疗与单纯放疗后宫颈癌患者的细胞免疫功能变化和生存期差异。**方法:** 68例宫颈癌患者, 放疗组38例, 联合治疗组30例; 分离患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 分别诱导培养CD3AK细胞、CIK细胞(cytokine-induced killer cell)、树突状细胞(dendritic cell, DC)、 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞。流式细胞术检测治疗前后患者外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD16⁺CD56⁺和 $\gamma\delta$ T细胞的比例和数量及PBMC中穿孔素、颗粒酶B和CD107a阳性表达率。对患者进行5年随访。**结果:** 联合治疗组大多患者生活质量均有改善, 联合组卡氏评分高于放疗组($P < 0.05$)。联合组治疗后患者的免疫细胞绝对值显著高于放疗组($P < 0.05$); PBMC的穿孔素、颗粒酶及CD107a均高于治疗前($P < 0.05$), 并显著高于放疗组($P < 0.05$)。联合治疗组中, 患者(I b-IV期)1、2和5年总生存率分别为93.3%(28/30)、83.3%(25/30)和76.6%(23/30), 明显高于放疗组的86.82%(33/38)、68.4%(26/38)和57.9%(22/38)($P < 0.05$); 以II b和III期患者疗效最显著。**结论:** 放疗联合自身免疫细胞治疗宫颈癌能提高患者的免疫功能, 并延长生存期。

[关键词] 宫颈癌; 过继免疫治疗; 放射治疗; 免疫功能; 免疫细胞

[中图分类号] R737.33; R730.51; R730.55

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0421-07

Clinical efficiency of radiotherapy combined with self-immune cell therapy for cervical carcinoma

ZHU Yue-hua¹, LIU Jun-quan², CAO Hui¹, CHEN Hui-ping¹, CHEN Fu-xing², CHEN Ling², ZHANG Song², LÜ Xiao-ting²(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 2. Department of Cancer Biotherapy, The 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To compare changes of cellular immune function and survival of cervical carcinoma patients receiving radiotherapy combined with self-immune cell therapy with those receiving radiotherapy alone. **Methods:** Sixty-eight cases of cervical carcinoma were divided into 2 groups: 38 cases in radiotherapy group; 30 cases in combination group (radiotherapy combined with self-immune cell therapy). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated, and then CD3AK cells, cytokine-induced killer cells (CIKs), dendritic cells (DCs), $\gamma\delta$ T cells and NK cells were induced and cultured. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺CD56⁺ and $\gamma\delta$ T cell numbers and ratios as well as the rate of positive expression of perforin, granzyme B (GraB), and CD107a of PBMCs were evaluated by FCM before and after treatment. The patients were followed by 5 years follow up study. **Results:** In most patients of the combination group, the quality of life was improved. The scores of Karnofsky in the combination group were significantly higher than those in the radiotherapy group ($P < 0.05$). The immune cell numbers in the combination group were significantly higher than those in the radiotherapy group ($P < 0.05$). The rates of the positive expression of perforin, GraB and CD107a of PBMCs were higher in the combination group than in the radiotherapy group correspondingly ($P < 0.05$). The over-all 1-, 2- and 5-year survival rates of I b-IV stage patients were 93.3% (28/30), 83.3% (25/30) and 76.6% (23/30) in the combination group, and were 86.82% (33/38), 68.4% (26/38) and 57.9% (22/38) in the radiotherapy group, respectively

[基金项目] 南京军区医学科技创新基金资助项目(No. 11MA040)。Project supported by the Medical Science and Technology Innovation Program of Nanjing Military Area Command (No. 11MA040)

[作者简介] 朱月华(1966-),女,江苏省句容市人,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤治疗的临床研究。E-mail: zhuyuehua97@163.com

[通信作者] 刘军权(LIU Jun-quan, corresponding author), E-mail: xzjq19600115@sina.com

($P < 0.05$) with II b and III stage patients showing the most significance. **Conclusion:** Radiotherapy combined with self-immune cell therapy for cervical carcinoma can enhance the immune function and increase the survival.

[**Key words**] cervical carcinoma; adoptive immunotherapy; radiotherapy; immune function; immune cell

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 421-427]

宫颈癌是由人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)引起的女性常见恶性肿瘤^[1-3], 我国每年新发病例为 13.15 万。目前对宫颈癌患者治疗方法主要是以手术为主并联合放疗的综合性治疗。宫颈癌患者往往存在严重的细胞免疫功能缺陷, 为提高肿瘤患者细胞免疫功能, 本课题组对不能手术的宫颈癌患者, 进行放疗联合自身免疫细胞[CD3AK 细胞、细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)、树突状细胞(dendritic cell, DC)、NK 细胞及 $\gamma\delta$ T 细胞等] 回输治疗, 取得了较好的临床疗效。

1 材料与方法

1.1 临床资料

病例筛选标准:(1)按国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)的分期标准:宫颈癌分期为 I b 期、II b 期、III 期、IV 期;(2)按规范接受过放射治疗;(3)年龄在 30 岁至 80 岁之间;(4)患者无严重心、肺、肝、肾等内科疾病。按入选标准选取 2000 年 1 月至 2007 年 1 月在我院接受治疗的宫颈癌患者 68 例, 年龄 30~70 岁, 平均(50.1 \pm 18.3)岁。病理检查:鳞状细胞癌 60 例, 宫颈内膜腺癌 6 例, 黏液腺癌 2 例。其中 I b 期 18 例、II b 期患者 21 例、III 期患者 15 例、IV 期患者 14 例。

按照治疗方案分为 2 组:(1)放疗组 38 例(其中 I b 期 10 例、II b 期 12 例、III 期 8 例、IV 期 8 例);(2)联合组 30 例(其中 I b 期 8 例、II b 期 9 例、III 期 7 例、IV 期 6 例)。平均年龄:放疗组为(50.7 \pm 17.4)岁, 联合组为(51.0 \pm 19.3)岁。两组间一般临床资料基本均衡。所有患者均签署知情同意书, 并报医院伦理委员会批准。

1.2 仪器及试剂

rhIL-2、rhIL-4、rhGM-CSF 和 rhIFN- γ 购自厦门特宝生物工程有限公司;人 CD3 单克隆、胎牛血清、RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司;淋巴细胞分离液购自中国科学院血液病研究所;人 AB 型血清购自徐州市血站;NK 细胞培养基购自德国 Cell Gro 公司;荧光标记的单抗和同型对照抗体 FITC-mIgG1、PE-mIgG2a 购自 BD 公司和 Pharmin-

gen 公司;CD3、CD4、CD8、CD25、CD16、CD56 单克隆抗体购自美国 BD 公司。FITC 标记的 Anti-TCR- $\gamma\delta$ 、PE 标记的穿孔素(perforin)、颗粒酶 B (granzyme B, GranB)、APC 标记的 CD107a 及 Fix&Perm 破膜剂均购自 ebioscience 公司;异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)、LPS 购自 Sigma 公司。流式细胞仪购自美国 BD 公司, 直线加速器购自美国瓦里公司。

1.3 自身 DC 的制备

用 Baxter CS-3000 血细胞分离机分离患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 采集血液总量 4 000~5 000 ml, 获取的 PBMC 数在 $2.0 \times 10^9 \sim 4.5 \times 10^9$ 之间。在进行 PBMC 采集时留取 100 ml 血浆在进行细胞回输时应用。将采集的 PBMC 离心弃上清, 加入等量 PBS, 将 PBMC 悬浮后加入淋巴细胞分离液上, 以 $2 000 \times g$ 离心 15 min, 吸取 PBMC, 用生理盐水洗涤 3 遍($1 500 \times g$ 离心, 10 min/次), 将细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 配成 1×10^6 /ml 的细胞悬液。按常规贴壁法选用贴壁细胞进行 DC 培养, 悬浮细胞用于其他细胞培养。在培养第 7 天的 DC 中加入 IFN- γ 2×10^3 U/ml、LPS 3 ng/ml, 9 d 时即成为成熟的 DC; 进行细菌和霉菌培养, 阴性后再收集细胞, 经无菌生理盐水洗 3 次, 将 DC 收集洗涤后悬于 2 ml 自身血浆中。每个疗程 DC 经浅表淋巴结或皮下注射 3 次, 静脉回输 1 次。每例患者每个疗程输注的成熟 DC 细胞总数在 $3 \times 10^7 \sim 7 \times 10^7$ 之间。

1.4 CIK 细胞的制备

按上述方法收集患者 PBMC, 按 1×10^6 /ml 悬浮于 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清、5% AB 血清和 IFN- γ 1×10^3 U/ml), 加入 GT-T503 细胞培养袋(2 000 ml/袋)内, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下培养 24 h 后, 加入 CD3 单克隆抗体至 1 μ g/ml、IL-2 至 200 U/ml。继续 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下培养。培养第 7 时进行细菌和霉菌培养, 阴性后再收集细胞, 经无菌生理盐水洗 3 次后将细胞悬浮于 100 ml 自身血浆中, 并加入 IL-2 至 500 U/ml, 用输血器回输给患者, 2 h 内输完。每个疗程将 CIK 细胞分 2 次静脉回输, 细胞总数为 $1 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{10}$ 个。

1.5 CD3AK 细胞的诱导

按上述方法收集患者 PBMC,按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬浮于 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清、5% AB 血清、CD3 单克隆抗体 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 IL-2 200 U/ml)中,加入 GT-T503 细胞培养袋(2 000 ml/袋)内,置 37°C 、5% CO_2 环境下培养。培养第 6 天时进行细菌和霉菌培养,阴性后按上述方法收集细胞。培养后的 CD3AK 细胞分 2 次静脉回输,细胞总数为 $1 \times 10^{10} \sim 4 \times 10^{10}$ 个。

1.6 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的培养和鉴定

将上述方法收集患者 PBMC,按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬浮于 RPMI 1640 培养基(含 3% 人自身血清、IL-2 100 U/L 和 IPP $3 \mu\text{g}/\text{ml}$)中,加入 GT-T503 细胞培养袋(2 000 ml/袋)内。收集培养 10 d 的贴壁生长细胞进行抗人 TCR- $\gamma\delta$ -FITC 表面标志检测,用于治疗 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞进行细菌和霉菌培养,阴性后按上述方法收集细胞。经培养后的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞分 2 次静脉回输,细胞总数为 $1 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{10}$ 个。

1.7 α -GalCer 荷载 DC 细胞

将 α -GalCer 用 DMSO 配成浓度为 $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$,震荡 α -GalCer 液, 37°C 、12 h;用之前超声水浴 37°C 、10 min;收集培养 6 d 的 DC 细胞加入上述 α -GalCer 液,至最终浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$,将上述二者的混合液于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,避光孵育 24 ~ 48 h。然后按上述方法收集细胞。经 α -GalCer 荷载的 DC 分 2 次静脉回输,细胞总数为 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 个。

1.8 NK 细胞的诱导及扩增

按上述方法分离患者外周血 PBMC,用 NK 细胞培养液(含 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷胺酰胺、20 mmol/L HEPES 缓冲液、青链双抗)将细胞配成 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,平分于 2 个 150 ml 塑料细胞培养瓶,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,隔天换液并调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,培养 10 d 后按上述方法收集细胞。培养后的 NK 细胞分 2 次静脉回输,细胞总数为 $0.5 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ 个。

1.9 放疗方法

两组宫颈癌患者均接受放疗,根据患者情况选择适宜的放疗方式,外照射分次剂量为 180 ~ 200 Gy。I b:盆腔四野照射,骨盆中平面 40 ~ 50 Gy/4 ~ 4.5 周;II 期:45 ~ 50 Gy/4.5 ~ 5 周;III、IV 期:45 ~ 60 Gy/5 ~ 6 周。内照射以 A 点、B 点为剂量计算参考点,A 点总剂量为 25 ~ 36 Gy,B 点总剂量为 40 ~ 50 Gy。

1.10 细胞免疫治疗方案

每次采集的细胞经培养后按不同细胞类型分别回输。除少数病情严重者 1 个月后进行第 2 次疗程外,多数患者均在 3 个月后进行第 2 次治疗。30 例患者中 3 例接受 3 个疗程的免疫细胞治疗(CIK、CD3AK、DC、 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞、 α -GalCer 荷载 DC 细胞和 NK 细胞),4 例接受 6 个疗程免疫细胞治疗,8 例接受 7 个疗程免疫细胞治疗,7 例接受 9 个疗程免疫细胞治疗,8 例接受 11 个疗程以上免疫细胞治疗。

1.11 观察指标及疗效判定

1.11.1 观察治疗前后免疫细胞亚群 于治疗前及治疗结束后 1 周抽取患者外周血 3 ml,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,细胞经 PBS 洗涤后配制成 $1 \times 10^7/\text{ml}$,每管各取 100 μl ,采用流式细胞术按说明书检测患者外周血 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}19^+$ 、 $\text{CD}16^+$ $\text{CD}56^+$ 和 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的数量和比例。

1.11.2 治疗前后患者 PBMC 中穿孔素、颗粒酶及 CD107a 表达的检测 抽取患者治疗前后外周血 3 ml,用淋巴细胞分离液分离 PBMC,细胞经 PBS 洗涤后配制成 $1 \times 10^7/\text{ml}$,每管各取 100 μl ,分别加入 Anti-TCR- $\gamma\delta$ 、Fix&Perm 破膜剂、perforin、GranB、APC 标记的 CD107a,孵育、洗涤后用流式细胞术检测和分析细胞。

1.11.3 疗效判定

治疗前后分别记录患者的 Karnofsky 评分;观察患者治疗前后免疫细胞数量和比例;观察免疫细胞输注之后患者的不良反应,如畏寒、寒战、皮疹等过敏反应和治疗前后肝功肾功能的情况。随访 5 年内患者的生存期。

1.12 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,定量资料组间比较采用单因素方差分析,定性资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法治疗后宫颈癌患者的一般情况

经联合治疗的宫颈癌患者食欲增加和体力增强者有 95%,疼痛减轻有 94%,睡眠改善有 73%,体质量增加(大于治疗前体质量 5%)有 90%。大部份患者随访过程中未发生病毒性感冒,患者一般情况改善较放疗组明显。1、2 和 5 年联合治疗组患者的 Karnofsky 评分高于放疗组($P < 0.05$,表 1)。

表1 联合治疗组和放疗组 Karnofsky 评分的比较

Tab. 1 Comparison of Karnofsky scores between radiotherapy and combination groups

Group	1 year	2 years	5 years
Radiotherapy(n = 38)	68.4 ± 3.6	63.6 ± 4.1	61.4 ± 3.7
Combination(n = 30)	81.3 ± 5.1*	78.5 ± 4.9*	73.3 ± 4.6*

* P < 0.05 vs radiotherapy group

2.2 两组患者治疗前后免疫细胞亚群的变化

联合治疗组和放疗组各细胞亚群比例治疗前后比较均无显著性变化。放疗组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD16⁺CD56⁺和 γδT 细胞绝对值明显低于治疗前(P < 0.05);而联合组显著高于治疗前(P < 0.05)。治疗后联合组的 CD3⁺和 γδT 细胞比例和绝对值均明显高于放疗组,该组的 CD4⁺、CD8⁺和 CD16⁺CD56⁺绝对值显著高于放疗组(P < 0.05)。图1显示1例联合组患者治疗前后外周血免疫细胞的变化,结果表明,放疗对患者免疫细胞有抑制作用;而联合治疗能提高免疫细胞的绝对值。

2.3 两组患者治疗前后 PBMC 中穿孔素、颗粒酶及

CD107a 的表达

放疗组治疗后患者 PBMC 中穿孔素、颗粒酶及 CD107a 明显低于治疗前(P < 0.05),联合组患者治疗后 PBMC 的穿孔素、颗粒酶及 CD107a 表达均高于治疗前(P < 0.05),并显著高于放疗组(P < 0.05 ,表3)。本文选择1例联合组患者治疗前后外周血免疫细胞检测,结果显示 CD3⁺CD8⁺和 CD16⁺CD56⁺细胞明显高于治疗前(P < 0.05 ,图1)。

2.4 两组患者治疗后的生存时间和不良反应

本研究无1例失访,联合组中,患者(I b-IV期) 1、2和5年总生存率分别为 93.3% (28/30)、83.3% (25/30)和 76.6% (23/30),明显高于放疗组的 86.82% (33/38)、68.4% (26/38)和 57.9% (22/38)(P < 0.05),以 II b 和 III 期患者差异最显著,但 IV 期患者5年生存率无统计学差异(表4)。由此可见,联合组患者生存率明显长于放疗组,而以 II b 和 III 期最明显。

联合组仅有2名患者在回输过程中出现恶寒,体温波动在 37.5℃ ~ 38.6℃,经对症处理后缓解。联合治疗对肝肾功能无明显影响。

表2 两组患者治疗前后免疫细胞亚群比较

Tab. 2 Comparison of immune cell subsets before and after treatment in radiotherapy and combination groups

Cell subset	Radiotherapy (n = 38)		Combination (n = 30)	
	pretreatment	posttreatment	pretreatment	posttreatment
CD3 ⁺				
Ratio (%)	69.77 ± 8.03	61.82 ± 5.25	67.52 ± 8.31	72.11 ± 9.30*
Number (× 10 ⁹)	0.92 ± 0.18	0.63 ± 0.17 [▲]	0.87 ± 0.15	1.49 ± 0.29* [▲]
CD4 ⁺				
Ratio (%)	34.31 ± 8.34	31.35 ± 6.85	33.35 ± 6.61	36.64 ± 7.34
Number (× 10 ⁹)	0.43 ± 0.12	0.27 ± 0.06 [▲]	0.50 ± 0.09	0.74 ± 0.15*
CD8 ⁺				
Ratio (%)	27.56 ± 7.45	25.15 ± 6.67	28.13 ± 3.40	30.52 ± 6.50
Number (× 10 ⁹)	0.44 ± 0.11	0.18 ± 0.05 [▲]	0.44 ± 0.08	0.71 ± 0.12* [▲]
CD19 ⁺				
Ratio (%)	7.52 ± 2.51	16.57 ± 1.04	8.52 ± 2.19	5.15 ± 1.12
Number (× 10 ⁹)	0.15 ± 0.06	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.06
CD16 ⁺ CD56 ⁺				
Ratio (%)	10.31 ± 4.21	13.83 ± 2.25	12.24 ± 5.60	15.13 ± 1.96
Number (× 10 ⁹)	0.27 ± 0.09	0.14 ± 0.08 [▲]	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.07*
γδTCR ⁺				
Ratio (%)	6.65 ± 1.42	3.39 ± 1.98 [▲]	6.21 ± 1.12	9.82 ± 1.14*
Number (× 10 ⁹)	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.01 [▲]	0.08 ± 0.02	0.22 ± 0.09* [▲]

* P < 0.05 radiotherapy group; [▲] P < 0.05 pretreatment

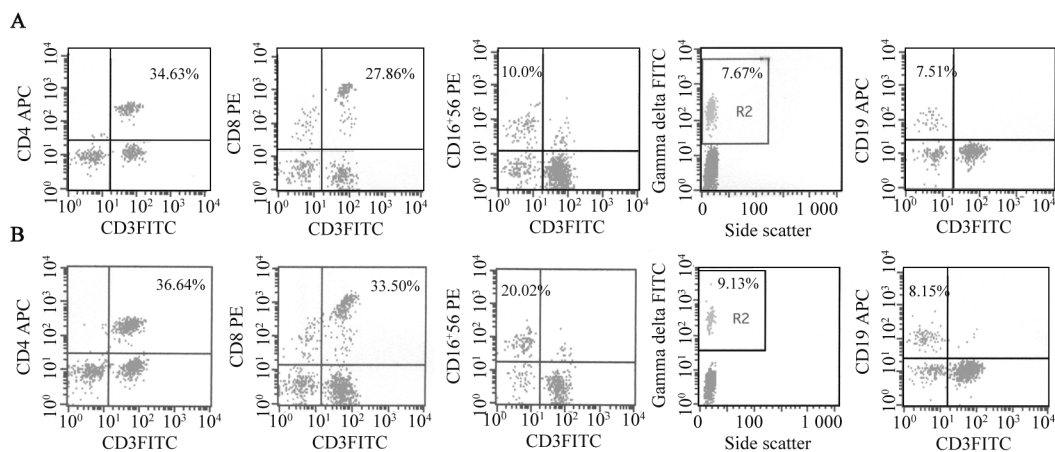


图 1 1例患者联合治疗前后外周血免疫细胞变化

Fig. 1 Change of peripheral blood immune cells of one patient before and after treatment in the combination group

A: Before treatment; B: After treatment

表 3 两组患者治疗前后 PBMC 中穿孔素、颗粒酶 B 及 CD107a 表达的比较(%)

Tab. 3 Comparison of expressions of perforin, granzyme B and CD107a before and after treatment in two groups(%)

Group	Perforin		Granzyme B		CD107a	
	Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment	Posttreatment
Radiotherapy(<i>n</i> = 38)	56.6 ± 3.4	52.3 ± 6.1 [▲]	31.2 ± 3.4	27.1 ± 3.2 [▲]	56.4 ± 2.6	55.1 ± 3.7 [▲]
Combination(<i>n</i> = 30)	55.7 ± 2.3	66.5 ± 3.8* [▲]	30.7 ± 3.5	40.2 ± 3.8*	54.6 ± 3.7	66.8 ± 4.4* [▲]

* *P* < 0.05 vs radiotherapy group; [▲] *P* < 0.05 vs pretreatment

表 4 两组患者治疗后不同分期宫颈癌患者的生存率(%)

Tab. 4 Survival rates of cervical carcinoma patients in different stages after treatment in two groups(%)

Stage	Survival rate of combination group				Survival rate of radiotherapy group			
	<i>n</i>	1 year	2 years	5 years	<i>n</i>	1 year	2 years	5 years
I b	10	100(10/10)	90.0(9/10)	90.0(9/10)	8	100(8/8)	100(8/8)*	100(8/8)*
II b	12	91.7(11/12)	75.0(9/12)	66.7(8/12)	9	100(9/9)	88.9(8/9)*	98.9(8/9)*
III	8	75.0(6/8)	62.5(5/8)	37.5(3/8)	7	85.7(6/7)*	85.7(6/7)*	71.4(5/7)
IV	8	75.0(6/8)	37.5(3/8)	25.0(2/8)	6	83.3(5/6)	50.0(3/6)	33.3(2/6)
total	38	86.8(33/38)	68.4(26/38)	57.9(22/38)	30	93.3(28/30)	83.3(25/30)*	76.6(23/30)*

* *P* < 0.05 vs radiotherapy group

3 讨论

宫颈癌的治疗主要是手术及放射治疗,尤其是鳞癌对放射治疗较敏感。近年来研究^[4,5]发现,宫颈癌患者免疫细胞数量减少和功能低下,尤其是晚期

患者这一现象更加明显。此外,晚期宫颈癌患者由于肿瘤体积较大,肿瘤微环境内常存在免疫抑制现象,化疗中,肿瘤细胞容易产生抵抗和免疫逃逸。近 20 年来,随着对宫颈癌免疫机制的不断了解,人们对宫颈癌免疫治疗进行了许多研究,取得了一定的

疗效^[6-9]。免疫编辑理论认为,在机体抗肿瘤免疫反应中固有免疫和适应性免疫细胞均参与这一过程。在免疫逃逸期由于肿瘤细胞分泌的许多免疫抑制因子,使进入肿瘤内的免疫细胞被“驯化”,从而形成以肿瘤细胞为中心的免疫抑制网络。因此,少量的免疫细胞和单一种类免疫细胞对晚期肿瘤难以取得好的治疗效果,必须采集大量的、功能正常的固有免疫细胞和适应性免疫细胞联合应用才能取得好的临床疗效^[10-11]。

本研究结果显示,联合治疗组在患者生存期、免疫细胞的改变和临床疗效等方面均好于单纯放疗组。由于放疗中放射线的照射在杀伤肿瘤细胞的同时也损伤体内免疫细胞,本组放疗后所测的细胞绝对值均低于放疗前即可证明。虽然放疗能暂时控制肿瘤生长,但由于未被照射的肿瘤周边组织仍存在肿瘤细胞,一段时间后肿瘤仍会继续生长。此外,放疗杀伤肿瘤细胞时可释放一些肿瘤抗原和“危险信号”,此时回输免疫细胞可以增强细胞免疫治疗的效果^[12-14]。因此,放疗如能和细胞免疫治疗有效地结合将提高治疗效果。

多种免疫细胞联合治疗对患者的免疫细胞数量恢复作用明显,从表2可以看出,治疗后免疫细胞绝对值均高于治疗前,更明显高于放疗后。这表明联合治疗除提高细胞免疫功能外,也增加了患者对放疗的耐受力。本研究使用的 CD3AK 细胞,在体外培养 10 d 时其主要细胞群为 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞 (CD3⁺ CD8⁺ T 细胞 90% 以上),这些细胞中有部分可能为肿瘤特异性 CTL。Karlsson 等^[15]用 16 例晚期结直肠癌的前哨淋巴结制备 CD3AK 细胞,然后进行回输治疗,16 例中 4 例为完全缓解 (complete response, CR)、1 例为部分缓解 (partial remission, PR)、11 例为进展 (progression of disease, PD)。NK 细胞能对不表达 MHC I、II 类分子的肿瘤细胞和经化疗后产生应激分子的肿瘤细胞进行杀伤^[16-17]。患者经输注 α -GalCer 荷载的 DC 细胞后, α -GalCer 在体内可以活化机体 NKT 细胞,促进 NKT 细胞的增殖,提高 NKT 细胞功能^[18-19]。NKT 细胞除通过穿孔素, FasL 等直接杀伤肿瘤细胞外,还通过分泌细胞因子如 INF- γ 来增强适应性免疫细胞和固有免疫细胞的杀伤活性^[20]。 $\gamma\delta$ T 细胞主要识别肿瘤细胞的应激抗原、脂质抗原和磷酸化抗原等,同时对肿瘤干细胞也具有杀伤作用。 $\gamma\delta$ T 细胞应用于临床已取得较好的临床效果^[21-23]。Kobayashi 等^[24]报道,用自身 $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增后回输治疗一例肾癌肺转移患者取得完全缓解。成熟 DC 通过静脉回输和

淋巴结附近注射,可以通过分泌细胞因子如 IL-12 来激活初始 T 细胞,荷载宫颈癌细胞抗原的 DC 在体内可以诱发适应性免疫应答^[25]。通过上述各种免疫细胞的联合应用可以杀伤具有不同免疫原性的肿瘤细胞(肿瘤干细胞),以及各种治疗后免疫逃逸的肿瘤细胞,从而达到杀伤肿瘤和预防肿瘤复发的目的。

本研究在进行免疫细胞治疗后对部分患者 PB-MC 中的穿孔素、颗粒酶 B 和 CD107a 进行了检测,发现联合组患者这些指标均明显高于治疗前。穿孔素是存在于细胞毒性 T 细胞、NK 和 $\gamma\delta$ T 细胞中的细胞毒颗粒,当这些细胞与靶细胞接触后可释放穿孔素,在靶细胞膜上形成多聚穿孔素管状通道,导致靶细胞溶解破坏^[26]。颗粒酶 B 是杀伤性 T 细胞和 NK 细胞颗粒中最重要的丝氨酸蛋白酶,可以进入靶细胞,激活 caspase 级联反应,从而迅速引起靶细胞 DNA 的断裂,导致靶细胞凋亡^[27]。有些含有细胞溶解性颗粒的细胞,其颗粒中含有包括穿孔素和颗粒酶等蛋白,在这些蛋白的外面包裹着一层 CD107a 脂质双分子层。当细胞毒细胞在活化后迅速脱颗粒,这一脱颗粒过程是穿孔素和颗粒酶杀伤靶细胞的关键步骤。因此,CD107a 也被作为细胞毒性细胞的一个重要标志。本研究的结果证明,CD107a 的表达上调与颗粒酶 B 和穿孔素相一致,也证实这一结论^[28]。这三种成分的增加有利于体内免疫效应细胞对肿瘤的杀伤。

从表4可以看出,联合组 I b、II b 和 III 期患者 5 年生存率明显高于放疗组,而 IV 期的宫颈癌患者效果不明显,这可能是由于晚期患者有多处转移,肿瘤体积过大,回输细胞不能杀伤所有肿瘤细胞;或者是肿瘤负荷太大,形成的肿瘤微环境内已建立抗宿主免疫的网络,进入瘤内的免疫细胞受肿瘤释放的免疫因子的抑制作用,而不能有效杀伤肿瘤细胞。此外,由于肿瘤内新生血管和淋巴管缺乏相应的黏附分子,血循环中免疫细胞难以进入瘤内行使杀伤功能^[29]。因此,对于晚期肿瘤应尽可能进行免疫细胞瘤内注射,并与介入治疗、化放疗等有机地结合起来才能提高治疗效果。

[参考文献]

- [1] Bynum SA, Brandt HM, Sharpe PA, et al. Working to close the gap: Identifying predictors of HPV vaccine uptake among young African American women [J]. J Health Care Poor Underserved, 2011, 22(2): 549-561.
- [2] Aljunid S, Zafar A, Saperi S, et al. Burden of disease associated with cervical cancer in Malaysia and potential costs and conse-

- quences of HPV vaccination [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(6): 1551-1559.
- [3] 王小兵, 张伟, 张叔人. 人乳头状瘤病毒(HPV)疫苗的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(1): 80-83.
- [4] Ovestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, et al. The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3 [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(4): 303-307.
- [5] 吕晓红, 程洪艳, 成夜霞, 等. 卵巢癌特异性免疫细胞治疗的体内外实验研究 [J]. *癌症*, 2008, 27(12): 1244-1250.
- [6] Kim HM, Lim J, Kang JS, et al. Inhibition of human cervical carcinoma growth by cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3): 375-380.
- [7] Li H, Wang Y, Zhou F. Effect of ex vivo-expanded $\gamma\delta$ -T cells combined with galectin-1 antibody on the growth of human cervical cancer xenografts in SCID mice [J]. *Clin Invest Med*, 2010, 33(5): E280- E289.
- [8] Su JH, Wu A, Scotney E, et al. Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential [J]. *BioDrugs*, 2010, 24(2): 109-129.
- [9] Nedergaard BS, Ladekar M, Thomsen HF, et al. Low density of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(8): 1135-1138.
- [10] 陈复兴, 李玺, 刘军权, 等. 肿瘤免疫编辑与免疫治疗 [J]. *医学与哲学*, 2007, 28(4): 59-61.
- [11] 台桂香. 肿瘤免疫治疗的研究进展和发展趋势 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(5): 5427-5432.
- [12] Liu WM, Fowler DW, Smith P, et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(1): 115-123.
- [13] Frazier JL, Han JE, Lim M, et al. Immunotherapy combined with chemotherapy in the treatment of tumors [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2010, 21(1): 187-194.
- [14] Ramakrishnan R, Gabrilovich DI. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(3): 419-423.
- [15] Karlsson M, Marits P, Dahl K et al. Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(7): 1747-1757.
- [16] Castriconi R, Daga A, Dondero A, et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties [J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3530-3539.
- [17] Pietra G, Manzini C, Vitale M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7): 793-801.
- [18] Ikarashi Y, Iizuka A, Koshidaka Y et al. Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells in mice primed with alpha-galactosylceramide [J]. *Immunology*, 2005, 116(1): 30-37.
- [19] Hsieh MH, Hung JT, Liw YW, et al. Synthesis and evaluation of acyl-chain- and galactose-6-modified analogues of α -galcer for NKT cell activation [J]. *ChemBiochem*, 2012, 13(11): 1689-1697.
- [20] Motohashi S, Nakayama T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(4): 638-645.
- [21] Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase- I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(11): 1599-1609.
- [22] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(4): 469-476.
- [23] 刘军权, 陈复兴, 巩新建, 等. 自身 $\gamma\delta$ T 细胞联合阿司匹林治疗晚期胃癌的实验研究和临床疗效观察 [J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(12): 32-36.
- [24] Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, et al. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(2): 575-579.
- [25] Roy S, Goswami S, Bose A, et al. Neem leaf glycoprotein partially rectifies suppressed dendritic cell functions and associated T cell efficacy in patients with stage III B cervical cancer [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(4): 571-579.
- [26] Urrea Moreno R, Gil J, Rodriguez-Sainz C, et al. Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function [J]. *Blood*, 2009, 113(2): 338-346.
- [27] Prakash MD, Bird CH, Bird PI. Active and zymogen forms of granzyme B are constitutively released from cytotoxic lymphocytes in the absence of target cell engagement [J]. *Immunol Cell Biol*, 2009, 87(3): 249-254.
- [28] Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity [J]. *Cell Immunol*, 2009, 254(2): 149-154.
- [29] Box C, Rogers SJ, Mendiola M, et al. Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3): 128-138.

[收稿日期] 2012 - 03 - 11 [修回日期] 2012 - 06 - 12

[本文编辑] 王莹