

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.003

DC-CIK 清除微小残留白血病的临床研究

刘清池^{1,3}, 张慧敏^{1,3}, 张玉娜², 庞宇慧^{1,3}, 马传宝^{1,3}, 杨会涛², 王荣孝^{1,3}, 熊建军^{1,3}, 高习华^{1,3}, 马亚辉^{1,3}, 胡晓东², 梁春耕^{1,3}, 冯新旺^{1,3}, 武大勇^{1,3}, 吴维海^{1,3} (1. 石家庄平安医院 血液科, 国家临床重点血液专科, 河北 石家庄 050021; 2. 石家庄平安医院 分子生物学实验室, 河北 石家庄 050021; 3. 石家庄博士血液病研究所, 河北 石家庄 050021)

[摘要] **目的:**观察异体树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞联合化疗清除微小残留白血病(minimal residual leukemia, MRL)的临床效果和安全性。**方法:**选择48例2009年1月至2011年6月石家庄平安医院收治的达到形态学完全缓解(complete remission, CR)但未达到分子学完全缓解(molecular CR, CRm)的急性白血病患者或MRL阳性白血病患者,依患者意愿分为联合组和化疗组,各24例,两组的一般资料和疾病程度相当;联合组应用DC-CIK细胞治疗和巩固化疗,化疗组仅应用巩固化疗。采集健康供者(患者的父母或子女)单个核细胞,制备DC-CIK细胞,每位患者输注4~6次,每次间隔15 d。Real-time PCR检测患者白血病特异基因或相关基因表达,流式细胞术检测患者MRL免疫表型组合、外周血淋巴细胞亚群的变化,记录治疗的不良反应发生情况。**结果:**随访至2012年6月。与化疗组相比,联合组CRm率显著提高[45.8% (11/24) vs 8.3% (2/24); $\chi^2 = 8.55, P < 0.01$], 四色流式细胞微小残留白血病免疫表型组合(four-color combination flow cytometric immunophenotype of minimal residual leukemia, CFIM)转阴率显著提高(66.7% vs 25.0%; $\chi^2 = 8.39, P < 0.01$), MRL清除显著提高(66.7% vs 25.0%; $\chi^2 = 8.39, P < 0.01$), 3年以上持续完全缓解(continued complete remission, CCR)率也明显更高(79.2% vs 45.8%; $\chi^2 = 5.69, P < 0.05$)。联合组治疗后患者淋巴细胞CD4⁺/CD8⁺比值较治疗前显著上升(1.3 ± 0.4 vs 0.8 ± 0.4, $P < 0.05$)。DC-CIK细胞输注未见严重不良反应。**结论:**DC-CIK细胞联合化疗能够抑制白血病相关基因,促进CFIM转阴、提高MRL清除率、改善患者免疫功能、延长缓解期,DC-CIK输注无严重不良反应。

[关键词] 白血病;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;微小残留白血病

[中图分类号] R730.51; R733.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)04-0398-06

Clinical study of DC-CIK (dendritic cells and cytokine-induced killer cells) eliminate minimal residual leukemia

Liu Qingchi^{1,3}, Zhang Huimin^{1,3}, Zhang Yuna², Pang Yuhui^{1,3}, Ma Chuanbao^{1,3}, Yang Huitao², Wang Rongxiao^{1,3}, Xiong Jianjun^{1,3}, Gao Xihua^{1,3}, Ma Yahui^{1,3}, Hu Xiaodong², Liang Chungeng^{1,3}, Feng Xinwang^{1,3}, Wu Dayong^{1,3}, Wu Weihai^{1,3} (1. National Clinical Emphasis Specialist, Department of Hematology, Ping'an Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, Hebei, China; 2. Molecular Biology Laboratory, Ping'an Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, Hebei, China; 3. Doctorial Institute of Hematology of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:**To evaluate the clinical efficacy and safety of allogenic dendritic cells (DCs) and cytokine-induced killer (CIK) cells combined with chemotherapy for eliminating minimal residual leukemia (MRL). **Methods:** Forty-eight acute leukemia patients with morphological complete remission (CR) but molecular complete remission (CRm), or patients with minimal residual leukemia (MRL) were selected from Ping'an Hospital of Shijiazhuang during Jan. 2009 to Jun. 2011. According to the patients' will, 48 patients were divided into combined group and chemotherapy group, with 24 each. All the patients were in the comparable general data and disease level. The combined group was

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目重大科技专项资助(No.09276102D-18)。Project supported by the Major Science and Technology Special Program of Science and Technology Supporting Foundation of Hebei Province (No.09276102D-18)

[作者简介] 刘清池(1965-),男,河北省文安县人,主任医师,主要从事血液病中西医结合的临床研究。E-mail:liuqingchi@sina.com

[通信作者] 刘清池(Liu Qingchi, correspondence author), E-mail: liuqingchi@sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130726.1502.001.html>

treated with DC-CIK and consolidation chemotherapy, and the chemotherapy group was treated with consolidation chemotherapy. PBMCs were collected from healthy donors (the patient's parents or children) to prepare DC-CIK cells. DC-CIK cells were intravenous injected into patients once every 15 days, a total of 4 - 6 times infusion. Expression of leukemia specific and related genes were detected by Real-time PCR. Changes of peripheral lymphocyte subsets and MRL immunophenotype in patients were detected by flow cytometry. Adverse reactions were examined. **Results:** All the patients were followed up to Jun. 2012. Compared with the chemotherapy group, the CRm rate of combined group was significantly raised (45.8% [11/24] vs 8.3% [2/24] ; $\chi^2 = 8.55, P < 0.01$); the four-color combination flow cytometric immunophenotype of minimal residual leukemia (CFIM) negative conversion rate of patients in the combined group was significantly raised (66.7% vs 25.0% , $\chi^2 = 8.39, P < 0.01$); the negative conversion rate of MRL was significant higher in the combined group (66.7% vs 25.0% , $\chi^2 = 8.39, P < 0.01$); the complete remission rate (CCR) of patients in the combined group after 3 years was significantly raised (79.2% vs 45.8% ; $\chi^2 = 5.69, P < 0.05$). After treatment the ratio of CD4⁺/CD8⁺ lymphocyte was significant increased in the combined group (1.3 ± 0.4 vs 0.8 ± 0.4 , $P < 0.05$). No serious adverse reactions were observed after DC-CIK infusion. **Conclusion:** DC-CIK combined with chemotherapy can inhibit leukemia related gene, promote the negative conversion of CFIM, facilitate the clear of MRL, improve immune function and prolong remission of the patients. No serious adverse reactions are found in patients receiving DC-CIK infusion. [**Key words**] leukemia; dendritic cell; cytokine-induced killer cell; minimal residual leukemia

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 398-403]

近年来细胞免疫治疗成为白血病治疗的前沿热点,细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞具有高效抗白血病细胞的作用,已用于急性白血病和淋巴瘤的治疗^[1-3]。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为一种高效抗原提呈细胞,与 CIK 细胞联用可诱导 CIK 细胞特异性应答、提高 CIK 细胞对靶细胞的杀伤效应,较单纯 CIK 细胞更为完善^[4-6]。现今急性白血病的缓解率已达 50% ~ 90%,但多数患者(除阳性急性髓系白血病)最终因为微小残留白血病(minimal residual leukemia, MRL)的存在而复发甚至死亡^[7-8],因此清除 MRL 是治愈白血病的关键。此前,本课题组采用自身 DC 联合 CIK(DC-CIK)细胞和中药治疗白血病取得较好疗效^[9-10],但自身 DC-CIK 细胞治疗受患者身体状况、免疫功能等因素影响,其推广应用受到限制。本研究观察自体 DC-CIK 联合化疗治疗形态学完全缓解期(complete remission, CR)但未达到分子学完全缓解(molecular CR, CRm)或 MRL 阳性的白血病患者的临床效果及其治疗安全性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取 48 例 2009 年 1 月至 2011 年 6 月石家庄平安医院收治的白血病患者(本组病例不含 PML/RAR α 阳性急性髓系白血病),按照 WHO 急性白血病诊断分型标准^[11]均诊断为 CR 期,但均未达 CRm,或四色流式细胞微小残留白血病免疫表型组

合(four-color combination flow cytometric immunophenotype of minimal residual leukemia, CFIM)阳性。按照患者意愿入选联合组 24 例,采用 DC-CIK 细胞联合巩固化疗;选择 24 例同期化疗患者作为对照的化疗组,仅采用巩固化疗。两组患者在性别、年龄、缓解期、病种分布、相关基因表达等方面差异无统计学意义(表 1)。健康半嵌合供体是经相关病毒学检查和健康体检合格的患者的父母或子女。两组患者和供者均签署知情同意书,研究程序和治疗方案经医院伦理委员会审查批准。

1.2 DC-CIK 细胞体外培养、扩增

选择健康半嵌合供者进行有核细胞分离,采集前用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)进行体外动员,当外周血细胞密度达 (3 ~ 5) × 10¹⁰ 个/L 时用血细胞分离机按 Auto-PBSC 程序行血细胞分离,并用淋巴细胞分离液(Ficoll)分离出单个核细胞, AIM-V 无血清培养基调整细胞密度为 (4 ~ 6) × 10⁶ 个/ml,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。此时培养基中出现非贴壁细胞和贴壁细胞。收集非贴壁细胞并调整细胞密度为 (1 ~ 2) × 10⁶ 个/ml,加入 1 000 U/ml 的 IFN- γ 悬浮培养 24 h,加入 1 μ g/ml 的 CD3 单克隆抗体和 1 000 U/ml 的 IL-2,每隔 3 d 换液 1 次,同时补充 IL-2 和 CD3 单克隆抗体,调整细胞密度为 (1 ~ 2) × 10⁶ 个/ml 进行增殖培养,收获 CIK 细胞。

收集 AIM-V 无血清培养基中的贴壁细胞,在

AIM-V 培养液中加入 1 000 U/ml 的 GM-CSF 和 1 000 U/ml 的 IL-4, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。每 3 d 换液 1 次并补充细胞因子, 第 6 天加入上述细胞因子的同时还加入 IL-1 β 、TNF- α 、PGE-2 等细胞因子诱导 DC 成熟, 培养 7~8 d 后收获 DC。计数收获的 DC 和 CIK 细胞, 将其按 1:3 的比例混合, 共培养 6 d, 获得 DC-CIK 细胞。

表 1 联合组与化疗组患者的一般资料

Tab. 1 General data of patients in combined group and chemotherapy group

Item	Combined group	Chemotherapy group	P
Gender(n)			
Male	20	20	
Female	4	4	
Age(median age) (t/a)	16 ~ 54(26)	17 ~ 54(25)	1.307
Disease type (n)			
ALL	3	3	
AML	21	21	
Remission period (t/month)	16.3 \pm 7.6	17.8 \pm 8.2	1.252
Positive gene (n)			
AML1/ETO	6	6	
BCF β /MYH11	3	3	
WT1	1	1	
IgH rearrangement	3	3	
Autologous	2ALL	2ALL	

ALL: Acute lymphocytic leukemia;

AML: Acute myelocytic leukemia

1.3 流式细胞术检测 DC-CIK 细胞群表型

在 DC 培养的第 8 天用流式细胞仪行 DC 免疫表型(CD86⁺、CD11⁺)分析; 在 CIK 细胞培养的第 8、14 天分别取少量细胞, 应用流式细胞仪做 CIK 细胞免疫表型(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺)分析。DC-CIK 细胞培养物共培养 6 d 后再次检测以上表型。采用荧光标记的单抗进行染色, 用 COULTER EPICS XL 型四色流式细胞仪检测, 用 Cell Quest 软件分析数据。

1.4 DC-CIK 细胞输注方案

DC-CIK 细胞混合液进行乙肝、丙肝、梅毒、HIV 病毒检测均呈阴性, 同时微生物、霉菌培养也均阴性; 锥虫蓝染色检测细胞活性达到 90%, 淋巴细胞比例 $\geq 70\%$; 有核细胞计数达 $1.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$ 个/ml; 检测细胞表型 CD86⁺、CD11⁺、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺ 表达 30%~50% 时, 准备输注。输注前地塞米松 5 mg 静脉注射以防止过敏, 生理盐水 250 ml 输注时前后冲液路。当天输注 4~6 h 后再静脉输入生理盐水 100 ml + IL-2(2.0×10^5 U), 次日输入生理盐水 100 ml + IL-2(2.0×10^5 U), 1 次/d, 共 4 d。每 15 d 输注 1 次, 输注 4~6 次后判断疗效。

1.5 巩固化疗方案

参照 2009 年急性髓系白血病治疗的专家共识^[12], 采用 TA(吡柔比星、阿糖胞苷)、HA(高三尖杉酯碱、阿糖胞苷)、MA(米托蒽醌、阿糖胞苷)、EA(依托泊甙、阿糖胞苷)、IDAD(中剂量阿糖胞苷、柔红霉素) 交替化疗, 每 1~3 个月用 1 次(疗程 5~7 d)。两组病例化疗方案、疗程间歇期相同。

1.6 Real-time PCR 检测白血病特异基因或相关基因的表达

每次骨髓检查时检测白血病特异基因或相关基因, 包括 AML1/ETO, CBF β /MYH11, BCR/ABL, WT1、IgH 基因重排和 TCR δ 基因重排。连续 2 次阴性则每 3~6 个月再检测 1 次, 持续阴性 1 年以上则每 6~12 个月检测 1 次, 再检测 2 次。

1.7 流式细胞术检测 MRL 免疫表型组合

根据患者初发病时的白血病细胞免疫表型确定其 CFIM。每次骨髓检查时检查 CFIM, 连续 2 次阴性后每 3~6 个月再检测 1 次, 持续阴性 1 年以上则每 6~12 个月检测 1 次, 再检测 2 次。

1.8 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群

治疗前后用流式细胞仪检测所有 48 例的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例, 比较治疗前后的变化。

1.9 临床一般指标及不良反应观察

(1) DC-CIK 输注次数和输注量; (2) 疾病状态; (3) 每次 DC-CIK 输注前后检查患者肝肾功能、心电图、尿液常规、大便常规。在输注 DC-CIK 过程中及输注后每天观察出现的不良反应, 观察项目及分级参照世界卫生组织规定的急性及亚急性毒性反应标准^[13]。

1.10 疗效评价

疗效评价参照《血液病诊断及疗效标准》中急性白血病疗效标准^[14]和国际工作组关于急性髓系白血病治疗试验的诊断、疗效标准的标准化、治疗结

局和报告标准的修订建议^[15]。

本研究临床随访至 2012 年 6 月,观察并统计研究对象的 CR、CCR、PR、NR 和复发情况;同时对患者进行分子血液学指标检测,以判断患者的 MRL 的清除程度:

(1)CRm:治疗前表达白血病特异基因或相关基因,治疗后转为阴性。本研究规定检测基因低于 1 000 个拷贝为该基因阴性。

(2)CFIM 转阴:本研究参照文献[16]的规定,CFIM 检测 MRL 细胞数 <0.01% 为阴性。

(3)MRL 清除:本研究规定,连续 2 次白血病特异基因或相关基因阴性,或连续 2 次 CFIM 阴性,判定为 MRL 清除。

1.11 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析。计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;CCR 生存期采用 Kaplan-Meier 法计算。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得 DC、CIK 细胞

DC 细胞培养体系中,刚分离的外周血单个核细胞呈球形,表面光滑,培养 2~3 h 后,可见部分贴壁细胞,呈圆形,均匀散在分布;诱导培养 3~4 d 后,为均匀散在分布的聚集体,胞体稍增大,形态不规则,细胞表面开始出现细小的树突状伪足;培养 6~7 d 后,胞体变得更大,表面出现大量毛刺状突起,具有典型树突状的细胞约占 50%~60%,部分细胞呈半贴壁悬浮状态。DC 细胞免疫表型检测结果显示,CD86⁺ 细胞占 (53.4 ± 8.3)%, CD11⁺ 细胞占 (50.3 ± 9.8)%。

CIK 细胞培养体系中,非贴壁细胞在前 3 d 内成团簇样生长,细胞团逐渐增多、增大、悬浮,细胞形态呈圆形、规则、透亮,在 7~12 d 的增殖速度最快。非贴壁细胞初始数量平均为 (1.7 ± 0.3) × 10⁶ 个,第 7 天细胞总数约为 (4.9 ± 0.8) × 10⁷ 个,平均增长了 30 倍;第 14 天 CIK 细胞总数达 (3.6 ± 0.7) × 10⁹ 个。CIK 细胞免疫表型检测结果:CD3⁺CD4⁺ 细胞占 (25.3 ± 7.2)%, CD3⁺CD8⁺ 细胞占 (65.6 ± 10.1)%, CD3⁺CD56⁺ 细胞占 (30.1 ± 5.4)%。

2.2 DC-CIK 细胞输注次数及输注量

联合组 24 例共接受 114 次 DC-CIK 细胞治疗,其中 15 例接受 4 次治疗,9 例接受 6 次治疗。每次输注的 DC-CIK 细胞总数为 1 × 10⁹ ~ 26.5 × 10⁹ 个细胞,平均输注量为 (8.1 ± 4.3) × 10⁹ 个/次。

2.3 DC-CIK 细胞联合化疗抑制白血病相关基因

联合组有 11 例达 CRm,其中 1 例输注 1 次 DC-CIK 细胞后白血病相关基因阴转,3 例 3 次后阴转,4 例 4 次后阴转,2 例 5 次后阴转,1 例 6 次后阴转,CRm 率为 45.7%。达 CRm 所需时间为 15~60 d,平均为 (40.7 ± 12.2) d。11 例白血病相关基因转阴患者包括 4 例 *AML1/ETO*、3 例 *CBF/MYH11*、1 例 *WT1*、3 例 *IgH* 基因重排 B 细胞急性淋巴细胞白血病(曾间断化疗 4 年 *IgH* 基因重排仍为阳性)。化疗组白血病相关基因阴转 2 例,CRm 率为 8.3%,其中 1 例 *AML1/ETO* 基因,1 例 *IgH* 基因重排;达 CRm 所需时间分别为 6 个月和 11 个月。两组 CRm 率的差异有统计学意义($\chi^2 = 8.55, P < 0.01$)。

采用 DC-CIK 细胞联合化疗达 CRm 的典型病例:1 例 *BCFβ/MYH11* 基因阳性急性髓细胞性白血病患者,男性,24 岁,化疗取得缓解后只巩固 1 个疗程,即用 DC-CIK 治疗,DC-CIK 细胞输注 3 次后 *BCFβ/MYH11* 阴转,至今保持阴性达 48 个月。另一例缓解后巩固治疗的 B 细胞急性淋巴细胞性白血病患者,坚持间断化疗 4 年,*IgH* 基因持续阳性,停用化疗,采用 DC-CIK 细胞治疗 3 次后 *IgH* 基因阴转,保持阴性至今达 42 个月。可见 DC-CIK 细胞联合化疗,对促进白血病相关基因阴转,取得 CRm 有确切的疗效。

2.4 DC-CIK 细胞联合化疗促进白血病患者 CFIM 转阴

联合组 CFIM 转为阴性水平者 16 例,CFIM 转阴率 66.7%。CFIM 转阴者包括 4 例 *AML1/ETO* 阳性急性髓细胞性白血病、3 例 *BCFβ/MYH11* 基因阳性急性髓系白血病、1 例 *WT1* 基因阳性 AML-2、3 例 *IgH* 基因重排 B 细胞急性淋巴细胞白血病、3 例 AML-M2、1 例 AML-M4 和 1 例 AML-M5。CFIM 阴转的中位时间为 60 d,均为 DC-CIK 细胞输注 3 次以上者。化疗组 CFIM 转为阴性者 6 例,CFIM 阴转率 25.0%,其中 1 例 *AML1/ETO* 基因、1 例 *IgH* 基因重排、3 例 AML-M2、1 例 AML-M4。联合组 CFIM 阴转率较化疗组显著提高($\chi^2 = 8.39, P < 0.01$)。

2.5 DC-CIK 细胞联合化疗提高 MRL 的清除率

联合组 16 例达 MRL 阴性,清除率 66.7%;化疗组 6 例达 MRL 阴性,清除率 25.0%。两组 MRL 清除率差异具有统计学意义($\chi^2 = 8.39, P < 0.01$)。

2.6 DC-CIK 细胞联合化疗改善 T 淋巴细胞亚群分布

联合组患者治疗后外周血中 CD4⁺ T 细胞比

例、CD8⁺T 细胞比例无显著的变化($P > 0.05$), 但 CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比值显著上升[(1.3 ± 0.4) vs

(0.8 ± 0.4), $P < 0.05$]; 而化疗组治疗前后外周血淋巴细胞亚群比例无明显变化($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 联合组与化疗组治疗前后患者外周血淋巴细胞亚群的变化

Tab. 2 Changes of peripheral lymphocyte subsets in combined group and chemotherapy group before and after treatment

Subset	Combined group		Chemotherapy group	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
CD4 ⁺ T (%)	24.7 ± 9.7	31.2 ± 8.8	25.3 ± 9.1	26.2 ± 10.1
CD8 ⁺ T (%)	26.5 ± 10.6	25.3 ± 11.9	24.5 ± 11.2	23.5 ± 13.4
CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T	0.8 ± 0.4	1.3 ± 0.4*	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.5

* $P < 0.05$ vs pre-treatment

2.7 DC-CIK 细胞联合化疗治疗提高白血病患者 CCR

随访至 2012 年 6 月中位随访时间 32 个月(12 ~ 38 个月)。联合组 24 例中 19 例保持 CR 达 3 年以上, 3 年以上 CCR 达 79.2%; 仅 5 例在 3 年内复发。化疗组 24 例中 11 例 CR 达 3 年以上, 3 年以上 CCR 达 45.8%; 13 例在 3 年内复发。联合组患者 3 年以上 CCR 率较化疗组显著提高($\chi^2 = 5.69$, $P < 0.05$)。

2.8 DC-CIK 细胞治疗的不良反应

DC-CIK 细胞输注后, 6 例患者出现发热, 体温 37.5 ~ 40.2 °C, 多发生于细胞输注后 0.5 ~ 2 h, 持续 1 ~ 3 h 后消退, 可伴有全身乏力、肌肉酸痛, 用地塞米松能很快缓解。未见外周血红细胞、白细胞及血小板的明显降低, 无肝功、肾功、心肌酶、血糖及电解质的异常变化。随访至 2012 年 6 月, 未见患者的心、肝、肾等重要器官功能损害, 未见感染性疾病、第二肿瘤等发生。

3 讨论

目前, 化疗可使多数急性白血病获得 CR, CR 后除 M3 型及儿童标准危险组 B 细胞 ALL 外, 其他患者的长期 CCR 率 < 50%, 多数 < 30%^[16], 其原因多为 MRL 得不到清除而复发^[17-18], 因此急性白血病 CR 后 MRL 的清除仍是治疗的重点和难点。化疗对 MRL 作用有限, 采用细胞免疫治疗清除 MRL 是目前的研究热点。体外研究^[19-20]发现, 健康人外周血单个核细胞诱导 DC 和 CIK 细胞, 由于 DC 能够增加 CIK 细胞的增殖能力和抗白血病活性, 将 DC 与 CIK 细胞共培养所获得的 DC-CIK 细胞有显著的抗白血病作用, 对

耐药白血病细胞和白血病干细胞也有杀伤作用^[19]。DC-CIK 细胞抗白血病机制主要有: (1) CIK 细胞对白血病细胞的直接杀伤, 在体内受某些淋巴因子作用后, CIK 细胞大量释放具有细胞毒性的胞质颗粒到胞外, 这些颗粒直接破坏肿瘤细胞; (2) 进入体内的 DC-CIK 细胞分泌多种细胞因子, 如干扰素- γ 、TNF- α 和 IL-2 等, 不仅对白血病细胞有直接抑制作用, 而且还可通过调节免疫系统间接杀伤白血病细胞; (3) CIK 细胞由于有抗凋亡基因表达, 因此在体内能抵抗 FasL 阳性白血病细胞对 CIK 细胞的反作用, 故 CIK 细胞能对白血病细胞持久地发挥作用。邓琦等^[20]采用自身 DC 皮下注射联合 CIK 静脉输注治疗 34 例缓解后急性白血病, 所有患者治疗结束后均处于血液学和遗传学缓解状态, T 细胞亚群、细胞因子水平和微小残留病灶检测取得满意结果, 治疗期间 8 例出现一过性低热反应, 无其他不良反应。周东风等^[21]回顾性总结了 47 例儿童急性白血病患者缓解后采用自身骨髓培养的 DC-CIK 细胞静脉回输治疗, 结果显示, CCR 率达 93.62%, 治疗前 MRL 阳性的 9 例患儿 8 例治疗后转阴, 治疗中少数患者仅见发热、皮疹轻微不良反应, 随访 5 ~ 72 个月未见心、肝、肾等重要器官功能损害, 未见感染性疾病、第二肿瘤等的发生。

白血病复发的原因主要是由于白血病干细胞和休眠期细胞的存在, 白血病干细胞、休眠期细胞(G_0 期细胞)对化疗药物不敏感。有研究^[19]发现, DC-CIK 细胞可以杀伤急性髓系白血病干细胞($CD34^+ CD38^- CD123^+$), 且 DC-CIK 细胞对急性髓系白血病干细胞的杀伤活性明显强于 CIK 细胞。另有研究^[22]发现, CIK 细胞对休眠的 G_0 期白血病细胞有明显杀伤作用。有研究^[23]表明, DC-CIK 细胞可以

下调白血病细胞多药耐药基因 MDR-1 的表达,逆转其耐药性,CIK 细胞对耐药白血病细胞具有杀伤效应^[24]。DC-CIK 细胞对白血病干细胞、休眠期白血病细胞、多药耐药白血病细胞的杀伤作用是单纯化疗所达不到的。

本研究选取化疗或(和)自体造血干细胞移植治疗后 CR 患者 24 例,经异体 DC-CIK 细胞输注方法治疗,12 例患者白血病相关基因阴转,16 例残留白血病细胞免疫表型组合达阴性水平,MRL 清除率为 63.3%,3 年 CCR 率高达 79.2%,MRL 清除率和 3 年以上 CCR 率明显高于化疗组。说明异体 DC-CIK 细胞联合化疗可延长缓解期,促进白血病特异基因阴转,清除 MRL,防止复发。观察发现,联合组治疗后患者免疫功能改善,辅助性 T 细胞比例增加,CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比值上升,且在不良反应观察中未见严重毒性作用。由此推测,DC-CIK 细胞可能通过直接杀伤白血病细胞和帮助恢复自身免疫功能两方面共同作用清除残留白血病细胞,从而清除 MRL。

总之,异体 DC-CIK 细胞联合化疗与单纯化疗相比能够更有效地清除 MRL,无严重不良反应,临床应用安全,该联合治疗方案为彻底根治白血病提供了有效手段。

[参考文献]

- [1] 程永贵,杨广民,肖中平. CIK 细胞对急性髓细胞白血病微小残留病作用的研究 [J]. 吉林医学, 2012, 33(8): 1571-1574.
- [2] Oliosio P, Giancola R, Di Riti M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: A pilot clinical trial [J]. Hematol Oncol, 2009, 27(3): 130-139.
- [3] Linn YC, Yong HX, Niam M, et al. A phase I/II clinical trial of autologous cytokine-induced killer cells as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission [J]. Cytotherapy, 2012, 14(7): 851-859.
- [4] 魏绪仓,赵文理,连小云,等. 树突状细胞对细胞因子诱导的杀伤细胞增殖和抗白血病作用影响的研究 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(12): 1603-1606.
- [5] 宋盈盈,苏荣英,艾丽梅. 树突状细胞——细胞因子诱导杀伤细胞体外抗白血病 K562 细胞的效应 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(49): 9208-9211.
- [6] 翟欣辉,魏绪仓,韩秀蕊,等. 脐血树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞协同抗急性白血病细胞效应及生物学活性研究 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2011, 32(1): 102-106.
- [7] 秘营昌,王建祥. 我国急性白血病的诊断治疗现状 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2006, 29(4): 290-291.
- [8] 洪国平,潘志远,陈海斌,等. 急性髓细胞白血病临床治疗的新进展 [J]. 肿瘤药学, 2012, 2(3): 166-168, 176.
- [9] 刘清池,吴维海,李刚荣,等. 凌丹康复方配合 DC-CIK 治疗白血病临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(4): 347-350.
- [10] 刘清池,吴维海,牛景月,等. 凌丹康复方并树突状细胞调节联合细胞因子诱导的杀伤细胞治疗缓解后急性白血病 5 例报告 [J]. 河北中医, 2007, 29(12): 1074-1076.
- [11] Bennett JM. World health organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome [J]. Int J Hematol, 2000, 72(2): 131-133.
- [12] 中华医学会血液学分会白血病学组. 急性髓系白血病治疗的专家共识 [J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(6): 429-431.
- [13] 孙燕. 临床肿瘤内科手册 [M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1991: 23.
- [14] 张之南,沈悒. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 3 版. 北京:科学出版社, 2007: 131-134.
- [15] Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia [J]. J Clin Oncology, 2003, 21(24): 4642-4649.
- [16] 童春荣,王卉,杨君芳,等. 流式细胞术定期监测微量残留病可预测急性白血病复发——单中心 163 例研究 [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(11): 748-751.
- [17] 陈竺,陈赛娟. 威廉姆斯血液学 [M]. 第 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2011, 1216: 1323-1324.
- [18] 孙楠楠,甘思林,孙慧,等. 流式细胞术动态监测急性白血病完全缓解后微小残留病与预后的关系 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(2): 339-342.
- [19] 张阳,张连生,曾鹏云,等. DC-CIK 对急性髓细胞白血病干细胞的杀伤作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(4): 404-408.
- [20] 邓琦,白雪,李玉明. 树突状细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞用于急性白血病治疗的研究 [J]. 天津医药, 2010, 38(11): 967-970.
- [21] 周东风,翟丽娜,潘峰,等. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养细胞过继免疫治疗儿童急性白血病 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(3): 166-169.
- [22] 惠吴函,徐娟,万岁桂,等. CIK 细胞对 G0 期急性髓系白血病细胞的杀伤作用 [J]. 首都医科大学学报, 28(5): 666-667.
- [23] 蒋东霞,杨晓博,赵婷茹,等. CIK 细胞体外逆转多药耐药性的研究 [J]. 河南医学研究, 2008, 17(1): 20-22.
- [24] 姚春,宋善俊. 脐血 CIK 细胞对耐药白血病细胞体外杀伤效应及其机制的研究 [J]. 临床血液学杂志, 2008, 21(7): 369-372.

[收稿日期] 2013-03-10

[修回日期] 2013-05-20

[本文编辑] 黄静怡