

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.014

· 临床研究 ·

## 自体 DC-CIK 细胞治疗晚期肾细胞癌的疗效

谭洁<sup>1</sup>, 王彬<sup>1</sup>, 何志洁<sup>1</sup>, 蔡俊霞<sup>1</sup>, 时建明<sup>1</sup>, 吴锦昌<sup>1</sup>, 时宏珍<sup>2</sup>(1. 苏州市肿瘤诊疗中心, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科, 江苏苏州 215001; 2. 南京市免疫细胞生物工程技术研究中心, 南京得康生物技术有限公司, 江苏南京 210019)

**[摘要]** **目的:**探讨自体树突状细胞(dendritic cell, DC)激活的细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞在晚期肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)治疗中的临床效果与安全性。**方法:**采集22例2011年7月至2012年6月期间南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科收治的22例RCC IV期患者[男性12例、女性10例,中位年龄60.8岁(21~79岁)]外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),体外制备成DC-CIK细胞。流式细胞术分析DC-CIK细胞中CD3<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、NK(CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)和NKT(CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)细胞的比例,MTT法检测DC-CIK细胞对白血病K562细胞(对NK细胞敏感)和肾癌786-0细胞(对NK细胞不敏感)的杀伤活性。受试患者于常规治疗(手术+化疗+放疗/细胞因子治疗)结束后4周进行DC-CIK细胞治疗,每次静脉回输细胞数约 $(5.0 \pm 0.5) \times 10^8$ 个,5次为1疗程,共3个疗程,分别于疗程开始前与结束后1周内监测患者外周免疫学指标(淋巴亚群、细胞因子谱),严密观察并记录治疗过程中的不良反应。**结果:**DC-CIK细胞组成为CD3<sup>+</sup>细胞占 $(86.92 \pm 5.32)\%$ 、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>(NKT细胞)占 $(52.04 \pm 7.33)\%$ 、CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>(NK细胞)占 $(7.85 \pm 3.15)\%$ ,DC-CIK细胞对786-0细胞和K562细胞的体外杀伤率相仿(效靶比为3:1时,杀伤率分别为 $(16.5 \pm 1.7)\%$ 和 $(18.4 \pm 1.9)\%$ , $P=0.014$ )。患者接受DC-CIK细胞治疗后,外周血淋巴细胞亚群(CD3<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK细胞)比例无显著变化( $P>0.05$ );外周血中IL-2、IL-12和IFN- $\gamma$ 细胞因子水平较治疗前明显提升(均 $P<0.05$ ),而TNF- $\alpha$ 和IL-10变化不明显(均 $P>0.05$ )。2例患者发生一过性发热,持续4~6h恢复,1例出现短期乏力。**结论:**DC-CIK细胞体外能有效杀伤786-0细胞和K562细胞。输注后可提升部分RCC患者免疫水平,安全性良好,可作为晚期RCC患者辅助治疗之一。

**[关键词]** 自体DC-CIK细胞;肾细胞癌;免疫治疗

**[中图分类号]** R737.11;R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0711-06

## Curative effect of autologous dendritic cell stimulated by cytokine-induced killer cells on metastatic renal carcinoma

Tan Jie<sup>1</sup>, Wang Bin<sup>1</sup>, He Zhijie<sup>1</sup>, Cai Junxia<sup>1</sup>, Shi Jianming<sup>1</sup>, Wu Jinchang<sup>1</sup>, Shi Hongzhen<sup>2</sup>(1. Cancer Diagnosis and Treatment Center of Suzhou, Department of Medical Oncology, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu, China; 2. Immune Cell Engineering Technology Research Center of Nanjing, Nanjing Decon Bio-Technology Co., LTD, Nanjing 210019, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the clinical effect and safety of autologous dendritic cells (DCs) stimulated by cytokine-induced killer (CIK) cells in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). **Methods:** During July 2011 to June 2012, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from 22 patients (12 males and 10 females, median age 60.8 years [21-79 years]) with advanced renal carcinoma in the Department of Medical Oncology of Suzhou Hospital affiliated to Nanjing Medical University, and DC-CIK cells were individually prepared from these PBMCs. Flow cytometry was performed to analyze the proportion of CD3<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, NK(CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) and NKT(CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) cells in the DC-CIK cells. The cytotoxicity of DC-CIK cells on leukemia K562 cells (sensitive to NK cells) and renal carcinoma 786-0 cells (insensitive to NK cells) was detected by MTT assay. DC-CIK cells therapy was started when

**[基金项目]** 苏州市科技计划资助项目(No. SS0524)。Project supported by the Science and Technology Project of Suzhou (No. SS0524)

**[作者简介]** 谭洁(1963-),女,陕西省西安市人,硕士,主任医师,主要从事肿瘤临床研究。E-mail: tanjie20130531@126.com

**[通信作者]** 时宏珍(Shi Hongzhen, corresponding author), E-mail: shi\_hongzhen@deconbio.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131202.1522.008.html>

the conventional therapy (surgery + chemotherapy + radiotherapy/ cytokine therapy) finished and continued for 4 weeks. Each time, about  $(5.0 \pm 0.5) \times 10^8$  DC-CIK cells were returned through intravenous transfusion, and each patient received 5 times (one cycle) of DC-CIK cells intravenous infusion. The immunological index such as lymphocyte subsets and cytokine concentration in the peripheral blood were detected before and after DC-CIK infusion. The adverse reactions during the treatment were closely observed and recorded. **Results:** In the total number of DC-CIK cells, the proportion of CD3 positive (CD3<sup>+</sup>) lymphocytes was  $(86.92 \pm 5.32)\%$ , while the proportions of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT cells and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK cells were  $(52.04 \pm 7.33)\%$  and  $(7.85 \pm 3.15)\%$  respectively. DC-CIK cells showed similar *in vitro* killing activities on 786-0 cells and K562 cells *in vitro*, with a killing rate of  $(16.5 \pm 1.7)\%$  and  $(18.4 \pm 1.9)\%$  respectively ( $P=0.014$ ), when the ratio of effect cells and target cells was 3:1. After patients received DC-CIK cell therapy, the proportion of peripheral lymphocyte sub-group (CD3<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK cells) showed no significant change ( $P>0.05$ ); compared to the cytokine levels prior to DC-CIK cells infusion, the levels of interleukine 2 (IL-2), interleukin 12 (IL-12) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) increased significantly ( $P<0.05$ ), while the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukine 10 (IL-10) changed unremarkably ( $P>0.05$ ). Two patients experienced a transient fever lasting 4-6 hours and one felt a short time of fatigue after DC-CIK cells infusion. **Conclusion:** DC-CIK cells can kill 786-0 cells and K562 cells effectively. The DC-CIK cells infusion may improve immune response of some patients with a safe level, and it can be one of the assistant treatment methods for advanced RCC patients.

[ **Key words** ] autologous dendritic cell stimulated cytokine-induced killer cells; renal cell cancer; immunotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 711-716 ]

肾细胞癌(renal cell cancer, RCC)约占成人恶性肿瘤的 3%, 晚期转移性 RCC 预后较差, 总生存期仅 12 个月, 5 年生存率小于 10%<sup>[1]</sup>。手术是治疗 RCC 的首选方法, 转移性 RCC 对化疗、放疗等均产生一定程度的抵抗。近年来, 随着生物治疗的发展, IL-2 联合 IFN- $\alpha$  已成为治疗转移性 RCC 的一线方案<sup>[2]</sup>。McDermott 等<sup>[3-4]</sup>报道, 使用高剂量 IL-2 尽管产生较大不良反应, 但可使一部分 RCC 患者达到完全缓解状态。Gollob 等<sup>[5]</sup>研究发现, 对 IL-2 治疗失败的 RCC 患者注射 IL-12 可诱导肿瘤缓解与稳定。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)均在 RCC 治疗中有良好的临床反应<sup>[6]</sup>。树突状细胞(dendritic cell, DC)是功能最为强大的专职抗原提呈细胞, 在抗肿瘤免疫中发挥关键作用; 其又是公认的天然免疫佐剂, 高水平表达多种免疫共刺激分子, 在 T、NK 和 NKT 淋巴细胞活化中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。本研究初步探讨 DC-CIK 细胞在晚期 RCC 治疗中的安全性和疗效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 一般资料

收集自 2011 年 7 月至 2012 年 6 月期间南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科收治的 22 例晚期 RCC, 其中男性 12 例, 女性 10 例, 中位年龄 60.8 岁(21~79 岁), 均经影像学和病理学确诊为 RCC IV

期。入选标准: 确诊为 RCC 患者, 年龄  $\geq 18$  岁, Karnofsky 评分  $>60$  分, 预期生存期  $>6$  个月。排除标准: 不符合入选条件者; 重要器官功能严重衰竭者; 心脏、肝及肾等器官移植者; 怀孕或正在哺乳的妇女; 严重的自身免疫性疾病。入选病例的信息见表 1。于患者常规治疗结束后 4 周进行 DC-CIK 细胞治疗, 一个疗程共回输 5 次, 共 3 个疗程, 疗程间隔 1 个月。DC-CIK 细胞治疗方案经过南京医科大学附属苏州医院伦理委员会审查批准, 治疗前所有接受治疗的患者均签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂与细胞株

RPMI 1640 培养基购自加拿大维森特公司, rh-GM-CSF、IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗 CD3 单抗与 IL-1 $\beta$  购自 R&D 公司, 淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司, 鼠抗人 FITC-CD3 抗体、PE-CD4 抗体、PerCP-CD8 抗体、APC-CD56 单抗均购自美国 BD 公司。内毒素检测试剂盒购自湛江安度斯生物有限公司, 细胞因子检测试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司。白血病 K562 细胞株和肾癌 786-0 细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。

### 1.3 DC 的体外培养

采用 COBE Spectra 血细胞分离机采集患者自体外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 用 0.9% 生理盐水洗涤 4 次, 然后使用 RPMI 1640 培养基调节细胞密度至  $2.5 \times 10^6 \sim$

$3 \times 10^6$  个/ml, 将细胞接种于 6 孔培养板, 置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 90 min 后吸取未贴壁细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL), 于孔中加入 DC 诱导培养液(含  $5\%$  自体血浆、rhGM-CSF  $100\text{ ng/ml}$ 、rhIL-4  $50\text{ ng/ml}$ ), 置  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中诱导,

第 3 天进行 1/3 换液, 第 5 天收获未成熟 DC(imature dendritic cell, imDC), 加入 IL- $1\beta$   $20\text{ ng/ml}$ 、PGE-2  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、TNF- $\alpha$   $20\text{ ng/ml}$  诱导 DC 成熟, 第 7 天收获成熟 DC(mature dendritic cell, mDC)。

表 1 入选 RCC 患者的基本信息

Tab. 1 Information for enrolled renal cell cancer patients

No.	Age	Sex	Stage	Metastasis	Previous therapy
1	79	Male	IV	Liver	Surgery, chemotherapy and cytokine
2	71	Female	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
3	21	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
4	65	Female	IV	Lung	Surgery and chemotherapy
5	70	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
6	62	Female	IV	Lung	Surgery and chemotherapy
7	70	Male	IV	Lung	Surgery and chemotherapy
8	49	Female	IV	Lung	Surgery and chemotherapy
9	49	Female	IV	Lung	Surgery and chemotherapy
10	56	Male	IV	Lung and liver	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
11	71	Female	IV	Liver	Surgery, chemotherapy and cytokine
12	76	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
13	74	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine
14	49	Female	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
15	74	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
16	47	Female	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine
17	56	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine
18	56	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
19	49	Female	IV	Lung and bone	Surgery, chemotherapy and radiotherapy
20	69	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine
21	66	Female	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine
22	59	Male	IV	Lung	Surgery, chemotherapy and cytokine

#### 1.4 CIK 细胞的体外培养

PBMC 贴壁培养后收获 PBL, 重悬于  $5\%$  自体血浆 RPMI 1640 培养液中, 调整细胞密度至  $2.5 \times 10^6$  个/ml, 铺入预先包被有 anti-CD3 mAb 的  $75\text{ cm}^2$  培养瓶中, 添加 IFN- $\gamma$  ( $1\ 000\text{ U/ml}$ ), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中孵育, 第 2 天添加 IL-1 $\alpha$ (终质量浓度  $10\text{ ng/ml}$ )、IL-2(终质量浓度  $250\text{ U/ml}$ ), 继续培养; 第 3 天添加含  $5\%$  自体血浆的 RPMI 1640 培养液, 此后实时观察细胞状态适当添液或扩瓶。

#### 1.5 DC 与 CIK 细胞共培养

CIK 细胞培养至第 7 天, 将细胞合并至一瓶, 将收获的 mDC 加入 CIK 细胞悬液中, 同时补充自体血浆浓度至  $10\%$ , 添加 IL-2 至  $250\text{ U/ml}$ , 轻轻吹打混匀, 按照每瓶  $60\text{ ml}$  平均分配到  $75\text{ cm}^2$  培养瓶中, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养, 培养 2~3 d 后细胞达到回输数量则可启动回输治疗。

#### 1.6 DC-CIK 细胞质量控制

每次治疗前 24 h 和 2 h, DC-CIK 细胞取样, 按

照《中华人民共和国药典》2010 版方法进行细胞活率、内毒素和革兰染色等检测, 细胞活率大于 90%, 检测无污染后方可收获回输。在回输当天取 50  $\mu\text{l}$  DC-CIK 细胞(  $1 \sim 3 \times 10^5$  个), 分别加入 5  $\mu\text{l}$  FITC-CD3、PerCP-CD8、APC-CD56 或 PE-CD4 单克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  培育 30 min 后, 每管加入 0.5 ml 预冷的含 2% 新生牛血清的 PBS 洗涤 2 遍, 流式细胞仪检测并应用 CellQuest 软件分析  $\text{CD3}^+\text{T}$ 、 $\text{CD8}^+\text{T}$ 、 $\text{CD4}^+\text{T}$ 、 $\text{NK}(\text{CD3}^-\text{CD56}^+)$  和  $\text{NKT}(\text{CD3}^+\text{CD56}^+)$  细胞比例。同时取样按照《中华人民共和国药典》2010 版方法进行无菌检测。

### 1.7 MTT 法检测 DC-CIK 细胞的杀伤活性

效应细胞为的 DC-CIK 细胞, 靶细胞 1 为对 NK 细胞敏感的白血病 K562 细胞, 靶细胞 2 为对 NK 细胞不敏感的肾癌 786-0 细胞。按效靶比为 30:1、10:1 和 3:1 接种至 96 孔培养板, 同时设靶细胞组(接种靶细胞  $1 \times 10^6$  个/孔)、效应细胞组(接种效应细胞  $1 \times 10^6$  个/孔)和空白组(仅培养基), 每组设 3 个平行孔, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h, 每孔吸弃 100  $\mu\text{l}$  上清, 再加入 20  $\mu\text{l}$  5 mg/ml 的 MTT, 继续培育 4 h, 加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO, 检测 570 nm 波长处光密度 ( $D$ ) 值。杀伤率(%) =  $1 - (D_{\text{实验组}} - D_{\text{效应组}} / D_{\text{靶细胞组}}) \times 100\%$ 。

### 1.8 DC-CIK 细胞回输方案

培养 9~13 d 时段中收集 DC-CIK 细胞, 离心、洗涤 3 次, 用含 10% 患者自体血浆的生理盐水重悬, 总体积为 100 ml。1 h 内经静脉回输患者, 每次细胞数约  $(5.0 \pm 0.5) \times 10^8$  个, 一个疗程共回输 5 次。

### 1.9 流式术检测 DC-CIK 对淋巴细胞亚群的影响

于治疗前及末次回输后 1 周采集患者外周血 5~6 ml, 分离血浆, ELISA 检测患者血清中 IL-2、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的水平。流式细胞术检测治疗前后患者淋巴亚群( $\text{CD3}^+\text{T}$ 、 $\text{CD4}^+\text{T}$ 、 $\text{CD8}^+\text{T}$ 、 $\text{CD3}^-\text{CD56}^+\text{NK}$  细胞)的比例。

### 1.10 DC-CIK 细胞治疗的安全性监测

DC-CIK 细胞回输前后均测量患者生命体征, 每次回输后 30 min 及 24 h 观察患者是否出现急性过敏反应。治疗过程中, 根据国家《抗肿瘤药物急性与亚急性毒性反应分度级标准》观察患者是否出现不良反应。治疗开始前 1 周及治疗结束后 1~2 周进行临床评价, 包括体格检查及血常规、肝肾功能等的检查, 严格观察不良反应的发生情况。

### 1.11 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Graphpad Prism 统计软件分析, 组间比较采用均数  $t$  检验, 以  $P < 0.05$

或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DC 刺激 CIK 细胞快速增殖

第 3 天镜下观察到细胞饱满透亮, 体积增大, 呈不规则状, 第 4 天细胞呈集落样生长。1~6 d 细胞增殖缓慢, 第 7 天加入 DC 后快速增殖, 第 9 天即可达回输数量, 其后始终处于快速生长期。至培养结束, 细胞数量平均增殖 56.1 倍(图 1)。

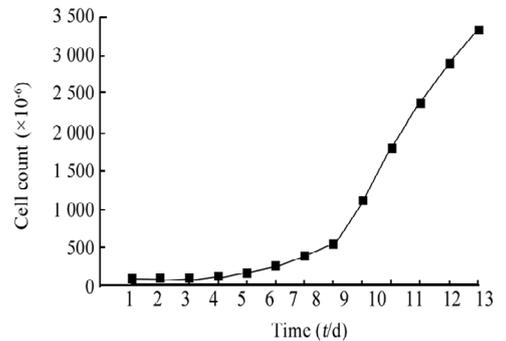


图 1 DC-CIK 细胞生长曲线图

Fig. 1 Growth curve of DC-CIK cells

### 2.2 DC-CIK 细胞表型分析

22 例患者 DC-CIK 细胞回输数量为  $(3321.68 \pm 121.33) \times 10^6$  个, 活率为 99.82%。表型检测结果显示, 随培养时间的增长, DC-CIK 细胞中的  $\text{NKT}(\text{CD3}^+\text{CD56}^+)$  细胞逐步增加, 收获时达到  $(52.04 \pm 7.33)\%$ , 较培养前的  $(3.01 \pm 1.87)\%$  显著增加 ( $P < 0.05$ );  $\text{CD8}^+\text{T}$  细胞比例也较培养前的  $(28.87 \pm 9.98)\%$  显著增加, 收获时达  $(55.48 \pm 6.92)\%$  (表 2,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 DC-CIK 细胞高效杀伤 K562 和 786-0 细胞

MTT 法检测结果(图 2)发现, DC-CIK 细胞对 K562 和 786-0 细胞均有强大的杀伤活性。当效靶比为 30:1 时, DC-CIK 细胞对它们的杀伤率分别达到  $(58.4 \pm 4.7)\%$  和  $(45.6 \pm 2.2)\%$  ( $P = 0.0003$ ); 效靶比为 3:1 时, 杀伤率分别为  $(18.4 \pm 1.9)\%$  和  $(16.5 \pm 1.7)\%$  ( $P = 0.014$ ); 效靶比 10:1 时, 杀伤率分别为  $(32.5 \pm 3.5)\%$  和  $(29.7 \pm 1.8)\%$  ( $P = 0.054$ )。

### 2.4 DC-CIK 细胞对外周血淋巴细胞亚群和细胞因子的影响

结果(图 3)显示, DC-CIK 细胞治疗前后各淋巴细胞亚群( $\text{CD3}^+\text{T}$ 、 $\text{CD4}^+\text{T}$ 、 $\text{CD8}^+\text{T}$ 、 $\text{CD3}^-\text{CD56}^+\text{T}$ ) 比例均无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

DC-CIK 细胞治疗后, IL-2 [ ( 1. 62 ± 0. 13 ) vs ( 1. 03 ± 0. 12 ) pg/ml,  $P = 0. 014$  ]、IL-12 [ ( 2. 27 ± 0. 67 ) vs ( 1. 09 ± 0. 19 ) pg/ml,  $P = 0. 004$  ]和 IFN- $\gamma$  [ ( 3. 43 ± 1. 01 ) vs ( 1. 69 ± 0. 88 ) pg/ml,  $P = 0. 00087$  ]

水平显著上升, 而 IL-10 [ ( 1. 24 ± 0. 33 ) vs ( 1. 23 ± 0. 23 ) pg/ml,  $P = 0. 922$  ]和 TNF- $\alpha$  [ ( 1. 16 ± 0. 24 ) vs ( 1. 30 ± 0. 27 ) pg/ml,  $P = 0. 082$  ]水平治疗前后变化不明显( 图 4 )。

表 2 DC-CIK 细胞表型统计( % )

Tab. 2 Phenotypic statistics of DC-CIK cells( % )

Culture time( t/d )	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>
1	62.43 ± 12.21	28.87 ± 9.98	45.34 ± 13.08	3.01 ± 1.87	10.32 ± 6.42
5	64.67 ± 13.78	29.88 ± 3.57	33.51 ± 12.41	19.65 ± 1.95	11.48 ± 5.76
7	72.53 ± 9.72	36.54 ± 4.32	30.07 ± 14.57	34.99 ± 6.02*	9.57 ± 4.24
9	86.92 ± 5.32	55.48 ± 6.92*	23.57 ± 9.21	52.04 ± 7.33*	7.85 ± 3.15
11	85.28 ± 7.91	60.77 ± 8.06*	22.14 ± 3.76	58.67 ± 9.54*	7.68 ± 3.92
13	85.50 ± 7.62	62.75 ± 5.87*	18.60 ± 2.83	58.56 ± 8.75*	8.68 ± 2.10

\*  $P < 0.05$  vs 1 d

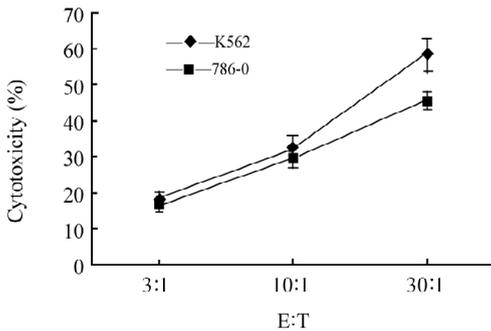


图 2 DC-CIK 细胞高效杀伤 K562 和 786-0 细胞

Fig. 2 High killing effect of DC-CIK cells on K562 and 786-0

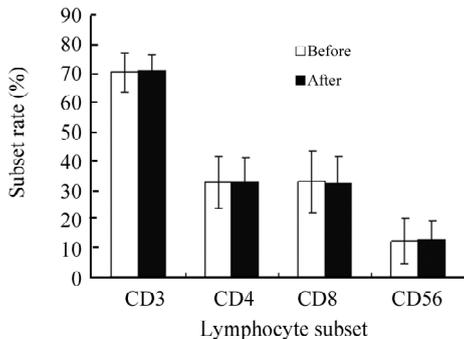


图 3 DC-CIK 细胞治疗对 RCC 患者外周血淋巴亚群比例的影响

Fig. 3 Proportion of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with RCC before and after DC-CIK cell infusion

2.5 DC-CIK 细胞治疗的安全性

22 例患者中有 2 例发生一过性发热, 发热至 38.5 ~ 39. 2 $^{\circ}$ C, 持续 4 ~ 6 h, 对症处理后恢复; 1 例患者出现短期乏力并自行恢复。未见其他严重不良反应。

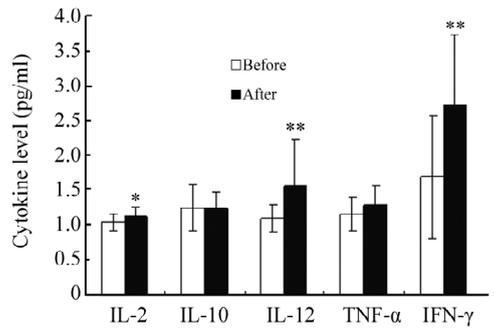


图 4 DC-CIK 细胞治疗对 RCC 患者外周血细胞因子水平的影响

Fig. 4 Levels of cytokines in patients with RCC before and after DC-CIK cell infusion

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

3 讨论

RCC 的发生、发展与患者的免疫功能有着密切的关系, 因此, 通过提高机体对肾癌细胞的免疫应答能力来抑制或清除肾癌细胞是治疗肿瘤的根本方法, 以免疫治疗为主的生物治疗已被公认为是治疗

肾癌的有效方法之一<sup>[8-10]</sup>。

DC 高表达共刺激分子和黏附分子,并能分泌 Th1 类细胞因子 IL-12,诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  和增强、激活 NK 细胞的细胞毒活性<sup>[11]</sup>。CIK 是一群异质细胞,兼具有 T 细胞的强大抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特点<sup>[12]</sup>。将具有高效杀瘤活性的 CIK 和 DC 共培养,可以起到协同作用。文献<sup>[13-15]</sup>报道,DC-CIK 细胞的增殖活性、杀伤活性以及分泌细胞因子的能力均较 CIK 细胞强。

本研究发现,DC 刺激 CIK 细胞后,DC-CIK 细胞迅速进入快速生长期,主要效应细胞 NKT 细胞比例显著增加,至收获时可达(52.04  $\pm$  7.33)% ,并一直维持到治疗结束。同时发现,DC-CIK 细胞对白血病 K562 细胞(对 NK 细胞敏感)和肾癌 786-0 细胞(对 NK 细胞不敏感)均有杀伤作用。

体内试验结果表明,22 例患者中仅 3 例发生一过性不良反应,说明 DC-CIK 细胞治疗是安全的。众所周知,大部分晚期肿瘤患者经过多疗程的放、化疗后免疫能力低下,且处于免疫抑制状态,较难调动患者的免疫应答。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 的杀瘤活性,IFN- $\gamma$  具有较强的抗肿瘤和免疫调节作用等。有研究发现,Th1 类细胞因子 IFN- $\gamma$  的量与患者疾病进展时间和总生存期成正相关<sup>[16]</sup>,可提示患者的预后情况<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,DC-CIK 细胞免疫治疗后患者外周血中 Th1 类细胞因子 IL-12 和 IFN- $\gamma$  水平显著升高,说明 DC-CIK 细胞治疗成功地调动了晚期肾癌患者的免疫功能。

本研究初步探讨了 DC-CIK 细胞体外杀伤肿瘤细胞的能力,临床安全性以及激发晚期肾癌患者免疫应答的能力,皆呈现了较好的结果,但是激发的免疫应答能维持多长时间,是否能延长晚期肾癌患者的疾病进展时间、提高生存率,还需要我们扩大样本数量,长期随访跟踪,进一步探讨研究。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Garcia JA, Rini BI. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma [ J ]. CA Cancer J Clin, 2007, 57 ( 2 ): 112-125.

[ 2 ] George S, Pili R, Carducci MA, et al. Role of immunotherapy for renal cell cancer in 2011 [ J ]. J Natl Compr Canc Netw, 2011, 9 ( 9 ): 1011-1018.

[ 3 ] McDermott DF. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma [ J ]. Cancer, 2009, 115( 10 ): 2298-2305.

[ 4 ] Rosenberg SA. Interleukin 2 for patients with renal cancer [ J ].

Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4( 9 ): 497.

[ 5 ] Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, et al. Phase I trial of twice-weekly intravenously interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: Ability to maintain IFN- $\gamma$  induction is associated with clinical response [ J ]. Clin Cancer Res, 2000, 6( 5 ): 1678-1692.

[ 6 ] Liu L, Zhang W, Qi X, et al. Randomized study of autologous cytokine induced killer cells in metastatic renal carcinoma [ J ]. Clin Cancer Res, 2012, 18( 6 ): 1751-1159.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] Jäkel CE, Hauser S, Rogenhofer S, et al. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma [ J ]. Clin Dev Immunol, 2012: 473245.

[ 9 ] Wang J, Liao L, Tan J. Dendritic cell-based vaccination for renal cell carcinoma: Challenges in clinical trials [ J ]. Immunotherapy, 2012, 4( 10 ):1031-1042.

[ 10 ] Mihalj Z, Sztupinszki Z, Surowiak P, et al. A comprehensive overview of targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma [ J ]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12( 7 ): 857-872.

[ 11 ] Kim JH, Lee Y, Bae YS, et al. Phase I / II study of immunotherapy using autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells in patients with metastatic renal cell carcinoma [ J ]. Clin Immunol, 2007, 125( 3 ): 257-267.

[ 12 ] Li R, Wang C, Liu L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: A phase II clinical study [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61( 11 ): 2125-2133.

[ 13 ] 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.

[ 14 ] 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 ): 3771-3777.

[ 15 ] 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 ):780-788.

[ 16 ] 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.

[ 17 ] Chen YL, Cheng WF, Chang MC, et al. Interferon-gamma in ascites could be a predictive biomarker of outcome in ovarian carcinoma [ J ]. Gynecol Oncol, 2013, 131( 1 ): 63-68.

[ 收稿日期 ] 2013 - 06 - 16

[ 修回日期 ] 2013 - 10 - 10

[ 本文编辑 ] 黄静怡