

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.001

· 研究快报 ·

## 负载自体热休克凋亡癌细胞抗原的 DC 治疗三阴性乳腺癌的随机对照多中心临床试验

时伟锋<sup>1</sup>, 唐金海<sup>2</sup>, 孟东<sup>1</sup>, 朱玉兰<sup>3</sup>, 朱晨瑶<sup>4</sup>, 栾燕<sup>4</sup>, 时宏珍<sup>4</sup>(1. 苏州大学附属无锡第四人民医院 乳腺外科, 江苏无锡 214062; 2. 江苏省肿瘤医院 乳腺外科, 江苏南京 210009; 3. 南京医科大学附属常州第二人民医院 乳腺外科, 江苏常州 213000; 4. 南京市免疫细胞技术研究工程中心, 江苏南京 210019)

**[摘要]** **目的:**评价自体热休克凋亡肿瘤细胞抗原负载 DC 对 I 到 IV 期 ER、PR、Her2 三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)患者治疗的疗效和患者对该治疗的耐受性。**方法:**入选南京、常州、无锡三地 3 个医院的 TNBC 患者 168 例,按照 2:1 的比例使用随机数字表将患者随机分组为 DC 免疫组 112 例、对照组 56 例。DC 疫苗治疗每周 1 次,4 次为 1 个疗程,疗程间间隔 1 个月,共 3 个疗程。疫苗治疗前、后检测患者外周血中细胞因子谱(IL-2、IL-10、IL-12、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ )水平和肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>T 细胞比例以及进行 DTH 试验。末次治疗后每 3 个月随访 1 次,随访 2 年,统计患者疾病无进展生存率(PFSR)。**结果:**I ~ III 期 TNBC 患者 DC 免疫治疗 1 个疗程后,IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平即较治疗前(基线)显著升高( $P_{IL-2} = 0.0384$ ,  $P_{TNF-\alpha} = 0.0237$ ,  $P_{IFN-\gamma} = 0.0221$ ),且随疗程增加其水平不断升高;而 IV 期 TNBC 患者治疗 3 个疗程后细胞因子水平均无明显提高。I ~ III 期 TNBC 患者外周血 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T 细胞比例提升速度与幅度较为缓慢,3 个疗程后提升幅度才显示有统计学意义( $P < 0.05$ )。患者的 DTH 试验阳性率伴随疗程数的增加而提升,两者呈正相关关系( $r = 0.973$ );早期(I 期和 II 期)TNBC 患者 DTH 平均阳性率明显高于中晚期患者(III 期和 IV 期)。2 年随访期内 I ~ II 期 TNBC 患者病情均较稳定,生存率 100%;III ~ IV 期 TNBC 患者 DC 治疗组 PFSR 明显高于对照组(71.43% vs 32.73%,  $P < 0.05$ )。I ~ IV 期 DTH 阳性患者的 PFSR 明显高于 DTH 阴性患者(87.30% vs 51.02%,  $P < 0.05$ )。治疗组 112 例 TNBC 患者对 DC 治疗耐受良好,未发现 II 级以上不良反应。**结论:**自体热休克凋亡肿瘤细胞抗原负载 DC 可有效诱导早期 TNBC 患者产生 Th1 型免疫应答反应,分泌高水平 Th1 型抗癌因子,3 个疗程后可激发明显的肿瘤抗原特异性 CTL 反应,DTH 试验可作为 DC 免疫有效性的评价指标之一。该 DC 免疫治疗方法可抑制晚期 TNBC 患者疾病进展,从而提高 PFSR,患者耐受性良好。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌;树突状细胞;疫苗;免疫治疗;随机对照试验

**[中图分类号]** R737.9; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0237-08

## Outcomes of patients with triple-negative breast cancer after vaccination with autologous dendritic cells loaded with apoptotic heat-shocked tumor antigen: Results from an multicenter randomized controlled clinical trial

Shi Weifeng<sup>1</sup>, Tang Jinhai<sup>2</sup>, Meng Dong<sup>1</sup>, Zhu Yulan<sup>3</sup>, Zhu Chenyao<sup>4</sup>, Luan Yan<sup>4</sup>, Shi Hongzhen<sup>4</sup>(1. Department of Breast Surgery, Wuxi Fourth People's Hospital Affiliated to Soochow University, Wuxi 214062, Jiangsu, China; 2. Department of Breast surgery, The Cancer Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 3. Department of Breast Surgery, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213000, Jiangsu, China; 4. Nanjing Immune Cell Technology Engineering Research Center, Nanjing 210019, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To assess the efficacy and safety profiles of vaccination with autologous DC loaded with apoptotic

**[基金项目]** 江苏省卫生厅重点基金项目资助(No. H200525);南京市科委重点基金项目资助(No. 201103058);常州市科技计划项目资助(No. CS2007215) Project supported by the Key Foundation Project of the Health Bureau of Jiangsu Province(No. H200525); the Key Foundation Project of Nanjing Science and Technology Commission(No. 201103058); the Science and Technology Plan Project of Changzhou City(No. CS2007215)

**[作者简介]** 时伟锋(1973-),男,江苏省无锡市人,硕士,主要从事乳腺癌治疗的基础和临床研究。E-mail: swfzj@hotmail.com

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

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.001.html>

heat-shocked autologous tumor cell antigens in the treatment of triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods:** A total of 168 patients with TNBC were recruited from three hospitals located, respectively, in Nanjing, Changzhou and Wuxi and randomized to a control group ( $n = 56$ ) and a treatment group ( $n = 112$ ). Patients in the treatment group were treated with DC vaccination for three cycles (one week each at an interval of one month) whereas those in the control group received placebo. The primary outcome measures were disease progression time (DPT) and progression-free survival rate (PFSR) at the end of 2-year follow up. The secondary outcome measures were side effects, tolerance to DC vaccination, tumor specific immune responses (*i. e.*, changes in IL-2, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  concentrations), the percentage of specific CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes in peripheral blood and delayed type IV hypersensitivity reaction (DTH) before and after DC vaccinations. **Results:** No more than level II side effects were observed in any of the participants. After one cycle of vaccination, there were significant and sustained increases in serum levels of Th1 type cytokines IL-2 ( $P = 0.038$ ), TNF- $\alpha$  ( $P = 0.024$ ) and IFN- $\gamma$  ( $P = 0.022$ ) in patients with stage I to stage III lesions. The number of tumor-specific CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes in the peripheral blood was increasing slowly and gradually over the course of vaccination therapy in patients with stage I to stage III lesions; by the third cycle of DC vaccination the number became significantly higher as compared with the placebo ( $P < 0.05$ ). Overall, the rate of DTH was positively correlated with the vaccination cycle ( $r = 0.973$ ,  $P < 0.05$ ). When disease stages were compared, the rate of DTH was significantly higher in patients with stage I to stage III disease than that in patients with stage IV lesions. The average DPT was 669 days in patients with stage I to stage III lesions and 656 days in stage IV patients in the treatment group, significantly longer than that in patients with stage I to stage III (618 days) and stage IV (573 days) lesions in the control group ( $P < 0.001$ ). The average PFSR of stage III and stage IV patients was 71.43% in the treatment group, but only 32.73% in the corresponding patients in the control group ( $P < 0.001$ ). Moreover, the average PFSR of DTH-positive patients was 87.30%, significantly higher than that of DTH-negative patients (51.02%). **Conclusion:** Autologous DC loaded with heat-shocked apoptotic autologous tumor cells may be effective in both eliciting the non-specific immune response of Th1 cells and tumor-specific CTL responses and delaying disease progression and improving survival in triple-negative breast cancer patients. [ **Key words** ] triple-negative breast cancer; dendritic cell; vaccination; immunotherapy; randomized controlled trial

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 237-244 ]

中国妇女乳腺癌发病率正以每年 3% 的速度递增<sup>[1]</sup>。依据癌组织表达雌激素受体( estrogen receptor, ER)、孕激素受体( progesterone receptor, PR)和表皮生长因子受体-2( human epidermal growth factor receptor-2, Her2)的不同,乳腺癌分为不同亚类<sup>[2]</sup>。三苯氧胺和甲地孕酮被用于 ER、PR 阳性乳腺癌患者,临床疗效达到 50%<sup>[3]</sup>。曲妥珠单抗被用于 Her2 阳性患者,临床有效率约为 24%<sup>[4]</sup>。然而,对于 ER、PR 和 Her2 均不表达的三阴性乳腺癌( triple-negative breast cancer, TNBC)患者,因缺乏明确的靶标和有效的治疗方法,5 年生存率为 81%,显著低于三阳性乳腺癌患者的 91%<sup>[5]</sup>。TNBC 占乳腺癌的 15% ~ 20%<sup>[6]</sup>,迫切需要开发新的治疗手段。20 世纪 90 年代,树突状细胞( Dendritic cell, DC)疫苗的出现给肿瘤患者带来了新的希望<sup>[7]</sup>。DC 具有捕获肿瘤细胞、加工提呈肿瘤抗原、激活静息性 T 淋巴细胞成为抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞( cytotoxic T lymphocyte, CTL)的功能<sup>[8]</sup>。DC 是天然的免疫佐剂,已被广泛应用于肿瘤疫苗的研制中<sup>[9-12]</sup>。本研究将 TNBC 患者自身癌组织制备成热休克凋亡

细胞抗原,将该抗原负载自体 DC,由 DC 识别和提呈肿瘤抗原,激发多克隆 CTL,抑制肿瘤的生长,为 TNBC 患者建立一种安全、有效的治疗方法。本研究从南京、常州、无锡三地的 3 家医院入选了 168 例 I ~ IV 期 TNBC 患者,以负载自体热休克凋亡癌细胞抗原的 DC 进行治疗,分为 DC 治疗组和对照组,经 2 年随访,评估患者对 DC 治疗的耐受性、非特异性和特异性免疫应答,以及患者疾病进展时间和生存率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 入选患者资料

本研究入选的 TNBC 患者来自苏州大学附属无锡第四人民医院、江苏省肿瘤医院和南京医科大学附属常州第二人民医院,均经免疫组织化学和病理学确诊,依据 TNM 分期标准进行分期( I-IV 期)。所有患者治疗方案经过医院伦理委员会批准,入选患者均签署知情同意书。患者纳入标准为:(1)年龄大于 18 周岁;(2)生活自理,卡氏体力状况评分 60 分以上;(4)预计生存期大于 6 个月;(5)患者入选

前需经过体格检查,造血功能正常:血红蛋白 > 10 g/dL,白细胞计数 > 3 000/mm<sup>3</sup>,血小板 > 100 000/mm<sup>3</sup>;肝肾功能正常(转氨酶 < 2 倍正常值上限,Cr < 2.0 mg/dL)。入组前 3 到 4 周患者均无其他治疗。本研究共入组 168 例 TNBC 患者,年龄为(27~81)岁。I 期 33 例,其中术后化疗 28 例、内分泌治疗 5 例;II 期 64 例,其中术后化疗 50 例、内分泌治疗 4 例、化疗联合内分泌治疗 10 例;III 期 32 例,其中术后化疗 27 例、内分泌治疗 2 例、化疗联合内分泌治疗 3 例;IV 期 39 例,其中新辅助化疗 29 例、术后化疗 31 例、化疗联合内分泌治疗 4 例、化疗联合内分泌治疗和局部放疗 4 例。按照 2:1 的比例使用随机数字表将患者随机分组,DC 治疗组 112 例,对照组 56 例。患者基本信息见表 1。

表 1 入组研究的 TNBC 患者基本信息(n)

Tab.1 Information for enrolled TNBC patients(n)

Index	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Age span( t/a )	30-81	27-81	27-80	37-46
DC vaccination	21	44	21	26
Control	11	20	11	13
Total number	33	64	32	39

## 1.2 主要试剂

重组人 GM-CSF、IL-4、IL-1 $\beta$ 、PGE-2 和 TNF- $\alpha$  均购自 Peprotech 公司,流式术使用抗体 CD8-PE、CD40-FITC、CD80-PE、CD83-FITC、CD86-PE、HLA-DR-PerCP、CD11c-APC、IFN $\gamma$ -FITC、Annexin-V-FITC 购自 BD 公司,白桦脂酸和 PI 采购自 Sigma 公司。细胞因子检测试剂盒购自 Bender 公司。

## 1.3 热休克凋亡肿瘤细胞抗原制备

参照时宏珍等<sup>[13]</sup>方法操作。手术获取肿瘤组织制备成单细胞悬液,用不连续密度梯度离心(密度 1.055 g/L,TBD)法分离瘤细胞,充分洗涤后用 RPMI 1640 培养基悬浮(含 5% 正常人 AB 血清),放入 42 °C 细胞培养箱热休克 3 h,加入 10  $\mu$ g/ml 白桦脂酸,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 36~48 h 后收获细胞作为抗原。按 2005 年版《中华人民共和国药典》规定进行支原体、无菌和内毒素的检测;以 Annexin-V-FITC 和 PI 双标记细胞,进行凋亡率检测;裸鼠成瘤实验和软琼脂克隆实验检测瘤细胞抗原体内、外致瘤性。

## 1.4 DC 制备与抗原负载

参照时宏珍等<sup>[14]</sup>方法操作。将采自患者的 PBMC 接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,贴壁 90 min 后洗去未贴壁细胞,加入 DC 诱导培养基(含 5% 自体血浆、100 ng/ml rhGM-CSF 和 50 ng/ml rhIL-4),诱导第 3 天进行 1/3 换液,第 5 天收获未成熟 DC(imDC);将 imDC 与肿瘤细胞抗原以 1:3 比例混合,孵育 24 h 后加入终质量浓度为 20 ng/ml IL-1 $\beta$ 、10  $\mu$ g/ml PGE-2、20 ng/ml TNF- $\alpha$  诱导 DC 成熟(mDC),24 h 后收获 DC。留样进行内毒素、支原体检测,无菌培养和 DC 表型检测。

## 1.5 DC 免疫治疗方案

分别在患者采血后第 1、2、3、4 周进行 4 次 DC 治疗(设定为一疗程),每次治疗 DC 数量为 6  $\times$  10<sup>6</sup> 个,于患者腹股沟近淋巴结富集区皮内注射,共免疫 3 个疗程,疗程间隔为 1 个月。注射后 45 min 内密切观察患者生命体征及过敏等不良反应。按照 NCI 的常见毒性标准(common toxicity criteria, CTC)对不良反应进行级。分别于 DC 治疗前 2~3 d 和每疗程末次治疗后第 7 天采集患者外周血,检测血浆细胞因子水平和肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞水平,同时进行 DTH 试验。

## 1.6 DC 治疗前后有关免疫学指标的检测

### 1.6.1 ELISA 法检测患者外周血中细胞因子水平

采集患者治疗前、后外周血 3 ml,分离血清,-20 °C 保存。按 ELISA 法试剂盒说明操作检测因子 IL-2、IL-10、IL-12、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 。

### 1.6.2 流式细胞术检测肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 淋巴细胞比例

参照文献<sup>[14]</sup>的方法,采集患者治疗前、后外周肝素抗凝血 10 ml,Ficoll 密度梯度法分离 PBMC 作为效应细胞,刺激细胞为负载抗原的 DC,未负载抗原的 DC 作为对照。将 PBMC 和 DC 按 10:1 比例共育 3 d,最后 5 h 添加 BFA(brefeldin A)至 10  $\mu$ g/ml;收获细胞,用预冷 PBS 洗涤和重悬,加入 PE-CD8 单抗标记 30 min,4% 多聚甲醛固定 15 min,再加入破膜剂 10 min,最后加入 IFN- $\gamma$ -FITC 单抗孵育 30 min,收获细胞,立即进行流式细胞仪检测,Cellquest 软件进行数据分析。

### 1.6.3 DTH(delayed type hypersensitivity)试验

分别于每一疗程末次 DC 治疗后第 7 天进行 DTH 试验。以 1 ml 注射器分别吸取负载抗原 DC 和生理盐水(对照),于患者两上肢前臂内侧皮内注射,做好相应标记。注射后 48~72 h 内观察注射部位有无红肿和结节出现,结节直径大于 5 mm 者判断为 DTH 试验阳性。

1.7 随访

第三个疗程末次治疗后, 每 3 个月对患者随访 1 次, 设定 2 年为随访周期。随访指标为: 患者生活质量、肿瘤标志物和影像学检查, 依据《实体瘤疗效评价标准》对疾病进展或稳定等进行判断, 记录疾病进展时间( disease progression time, DPT)和无进展生存率( progression-free survival rate, PFSR)。

1.8 统计学处理

采用 Graphpad Prism 软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 相关性分析采用线性回归分析, 无进展生存率采用对数检验分析, 生存率曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制并分

析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各期 TNBC 患者 DC 表型的分析

流式细胞术检测结果显示, DC 疫苗制备过程中诱导第 5 天, imDCs 免疫共刺激分子 CD40、CD80、CD83 和 CD86 均低水平表达, 加入热休克凋亡肿瘤细胞抗原和促成成熟因子后, 共刺激分子表达水平显著上升 ( $P < 0.01$ )。不同分期 TNBC 患者 DC 共刺激分子表达水平未发现差异(表 2)。

表 2 不同分期 TNBC 患者 DC 共刺激分子表达水平 (%)

Tab. 2 The levels of co-stimulators expression of DCs from all stages of TNBC patients( %)

Phenotype	CD11c <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	CD40 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup>
Stage I (n = 21)	92.16 ± 3.98	82.32 ± 3.59	92.66 ± 5.15	72.16 ± 4.02	93.63 ± 2.48
Stage II (n = 44)	92.16 ± 5.04	80.53 ± 4.51	88.69 ± 7.84	71.58 ± 3.34	94.79 ± 1.90
Stage III (n = 21)	91.05 ± 4.31	82.16 ± 3.72	91.24 ± 6.84	70.79 ± 2.97	93.63 ± 2.43
Stage IV (n = 26)	92.53 ± 4.02	81.94 ± 3.78	89.22 ± 7.78	72.21 ± 3.37	94.05 ± 2.01

2.2 DC 疫苗可激发患者 Th1 型免疫应答

TNBC 患者接受 1 至 3 个疗程 DC 治疗后, 外周血清中细胞因子水平变化见表 3。表中可见, 第 1 疗程后 Th1 型细胞因子即被激发, IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平显著升高 ( $P_{IL-2} = 0.0384$ 、 $P_{TNF-\alpha} = 0.0237$ 、 $P_{IFN-\gamma} = 0.0221$ ), 而 IL-10 和 IL-12 水平无明显变化; 第 2 疗程前和第 3 疗程前, I ~ III 期 TNBC 患者 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的水平仍维持较高水平(与基线比较)。随着 DC 免疫次数的增加, IL-2 和 TNF- $\alpha$  水平不断提升, IFN- $\gamma$  水平在第 2 疗程后达到高峰, 并维持较长时间。但 IV 期 TNBC 患者 IL-2、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$  水平在各疗程免疫前后均无明显变化。结果表明, DC 疫苗可以在第 1 疗程后高效地激发早期 TNBC 患者产生较持久的 Th1 型免疫应答反应。

2.3 DC 疫苗可诱导肿瘤特异性 CTL

研究结果显示, DC 免疫后各期 TNBC 患者外周血中肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 淋巴细胞与基线比较均有一定程度的提高, 以第 3 疗程后最为明显。1 个疗程后变化不显著; 2 个疗程后与基线相比变化仍不显著; 3 个疗程后 I ~ III 期患者 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 淋巴细胞数量得到了显著的扩增 [(2.17 ±

0.32)% , (1.98 ± 0.50)% , (2.01 ± 0.29)% vs (0.47 ± 0.12)% , (0.56 ± 0.13)% , (0.63 ± 0.14)% ; 均  $P < 0.05$ ]。但 IV 期患者治疗全过程中变化均不显著。图 1 显示了 4 例 I ~ IV 期 TNBC 患者 DC 免疫前后 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 淋巴细胞流式细胞检测图谱。结果表明, 热休克凋亡癌细胞抗原负载的 DC 可以诱导患者建立特异性 CTL 免疫应答, 晚期患者可能需要更多疗程的免疫治疗。

2.4 患者 DTH 阳性率与 DC 治疗疗程呈正相关

表 4 罗列了 1 ~ 3 个疗程 DC 治疗后各期 TNBC 患者 DTH 试验结果, 第 3 和第 2 疗程后, I ~ IV 期 TNBC 患者 DTH 阳性率较第 1 疗程有所提高; 第 3 疗程后 DTH 阳性率增加明显。分析发现, DTH 试验阳性率与 DC 疗程数呈正相关 ( $r = 0.973$ )。部分患者 DTH 阳性结节直径也随着免疫疗程数的增加而增大。早期(I 期和 II 期)TNBC 患者 DTH 平均阳性率明显高于中晚期患者(III 期和 IV 期)。

2.5 DC 疫苗可延长晚期 TNBC 患者疾病进展时间

2 年随访期内治疗组患者脱落 22 例, 对照组患者脱落 12 例, 脱落率分别为 19.6% 和 21.4%。其中无论治疗组还是对照组, I 期和 II 期患者病情均较稳定, 生存率 100%。治疗组的 III 期和 IV 期患者

平均 DPT 分别为 669 d 和 656 d,对照组患者分别为 618 d 和 573 d,分别延长了 51 d 和 83 d; III 期和 IV 期患者的 PFSR 亦显著高于对照组(图 2),分别为 71.43% 和 32.73% ( $P < 0.05$ )。结果表明,自体热

休克凋亡肿瘤细胞抗原负载的 DC 可以有效地抑制晚期 TNBC 患者乳腺癌的进展,延长疾病进展时间,提高患者生存质量。

表 3 不同分期 TNBC 患者第 1 疗程 DC 免疫前后细胞因子水平的变化( $\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Tab. 3 Cytokine profiles of TNBC patients of stage I to stage IV after one cycle of DC vaccination( $\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

Cytokine		Stage I (n = 21)	Stage II (n = 44)	Stage III (n = 21)	Stage IV (n = 26)
IL-2	pre-DC Vac.	90.80 ± 20.64	50.18 ± 6.47	45.67 ± 4.52	51.13 ± 2.89
	post-DC Vac.	345.53 ± 43.31	95.99 ± 8.26	58.00 ± 8.34	43.31 ± 5.34
	P value	0.0026	0.0464	0.2121	0.2333
IL-10	pre-DC Vac.	34.44 ± 4.23	36.43 ± 5.32	33.09 ± 3.98	34.95 ± 5.23
	post-DC Vac.	33.50 ± 4.13	35.24 ± 4.24	33.52 ± 3.22	35.03 ± 4.26
	P value	0.8242	0.7973	0.8924	0.7897
IL-12	pre-DC Vac.	46.25 ± 6.84	51.67 ± 9.25	65.67 ± 20.41	21.69 ± 6.74
	post-DC Vac.	48.73 ± 4.39	69.22 ± 20.73	72.74 ± 14.97	19.73 ± 5.53
	P value	0.8563	0.4507	0.7817	0.8268
TNF- $\alpha$	pre-DC Vac.	32.94 ± 9.95	20.89 ± 6.05	23.99 ± 3.72	33.13 ± 3.52
	post-DC Vac.	63.36 ± 9.53	41.00 ± 5.08	37.18 ± 7.09	27.08 ± 2.82
	P value	0.0207	0.0393	0.0495	0.2510
IFN- $\gamma$	pre-DC Vac.	55.01 ± 10.32	11.11 ± 1.09	32.39 ± 7.81	23.31 ± 8.33
	post-DC Vac.	100.30 ± 22.37	47.22 ± 9.85	67.53 ± 12.49	25.91 ± 9.49
	P value	0.0470	0.0184	0.0497	0.8668

同时,结果还显示, I~IV 期 DTH 阳性患者的 DPT 和 PFSR 与 DTH 阴性患者的比较存在显著差异(DPT:708 d vs 679 d;PFSR:87.30% vs 51.02%;均  $P < 0.05$ ) (图 3)。结果表明,特异性免疫应答水平可以提示 TNBC 患者的预后情况。

### 2.6 DC 免疫治疗后患者的耐受性良好

DC 免疫治疗后 24 h 内患者各项生命体征正常,未出现恶心、寒战、发热、红肿、乏力、疼痛、麻木等不良反应。治疗前后的血常规、肝和肾功能等指标无明显变化,患者耐受性良好。

## 3 讨论

近年来,随着基因工程技术和免疫学理论发展,乳腺癌的诊断、治疗和预后判断得到了快速进步<sup>[16-19]</sup>。ER、PR 和 EGRF 家族成员如 Her2 已被证明与乳腺癌的发生、发展和转移密切相关<sup>[20-22]</sup>。基于这些分子在乳腺癌细胞中的异常表达,乳腺癌通常被分为 ER<sup>+</sup> PR<sup>+</sup> 双阳性、ER<sup>-</sup> PR<sup>-</sup> 双阴性、ER<sup>-</sup>

PR<sup>-</sup> Her2<sup>-</sup> 三阴性和 Her2<sup>+</sup> 阳性等亚型。三阴性患者(TNBC)对于常规的内分泌治疗不敏感,且缺乏分子治疗靶点,导致病死率相对较高,对于 TNBC 患者急需引入新的治疗手段。

DC 在机体抗肿瘤免疫应答过程中的重要作用已使其成为肿瘤治疗的一种新希望与新方法,DC 可同时提供激活静息性 T 细胞的第一(抗原)和第二信号(共刺激分子)<sup>[23-24]</sup>。但常有报道,DC 疫苗的临床疗效明显低于实验室中的实验效果<sup>[25-26]</sup>。抗原性、抗原形式、免疫佐剂、DC 成熟度等均是影响 DC 免疫疗效的关键因素<sup>[27]</sup>。已有文献<sup>[28-30]</sup>报道,采用 HLA-A201 限制性 Her2 多肽、MUC1 多肽(或其他已知的乳腺癌抗原多肽)、编码 Her2 的 RNA 或者肿瘤细胞裂解液作为抗原负载 DC,然后制备治疗乳腺癌的 DC 疫苗。然而,TNBC 患者的抗原表达谱并不明确,而肿瘤细胞裂解液在制备过程中会丢失部分抗原,因此本研究选择采用完整肿瘤细胞作为抗原,从而保持抗原库的完整性。

前期研究<sup>[13]</sup>已表明,与非热休克凋亡肿瘤细胞负载的 DC 相比,热休克凋亡肿瘤细胞负载的 DC 能够在体外激发更强的特异性细胞免疫反应。本研究着力探讨负载自体热休克凋亡肿瘤细胞的 DC 在体内是否发挥同样的功能,癌症严重程度是否影响免疫应答水平,该类 DC 疫苗是否可抑制癌症进展。

本研究筛选了南京、无锡、常州三地 3 个医院 168 名 I 期到 IV 期的 TNBC 患者,采集了患者 PBMC 并诱导成 DC,结果表明:各期 TNBC 患者 DC 的数量和表型均无显著差异,均能诱导高表达共刺激分子,包括 CD40、CD80、CD83 和 CD86 等。

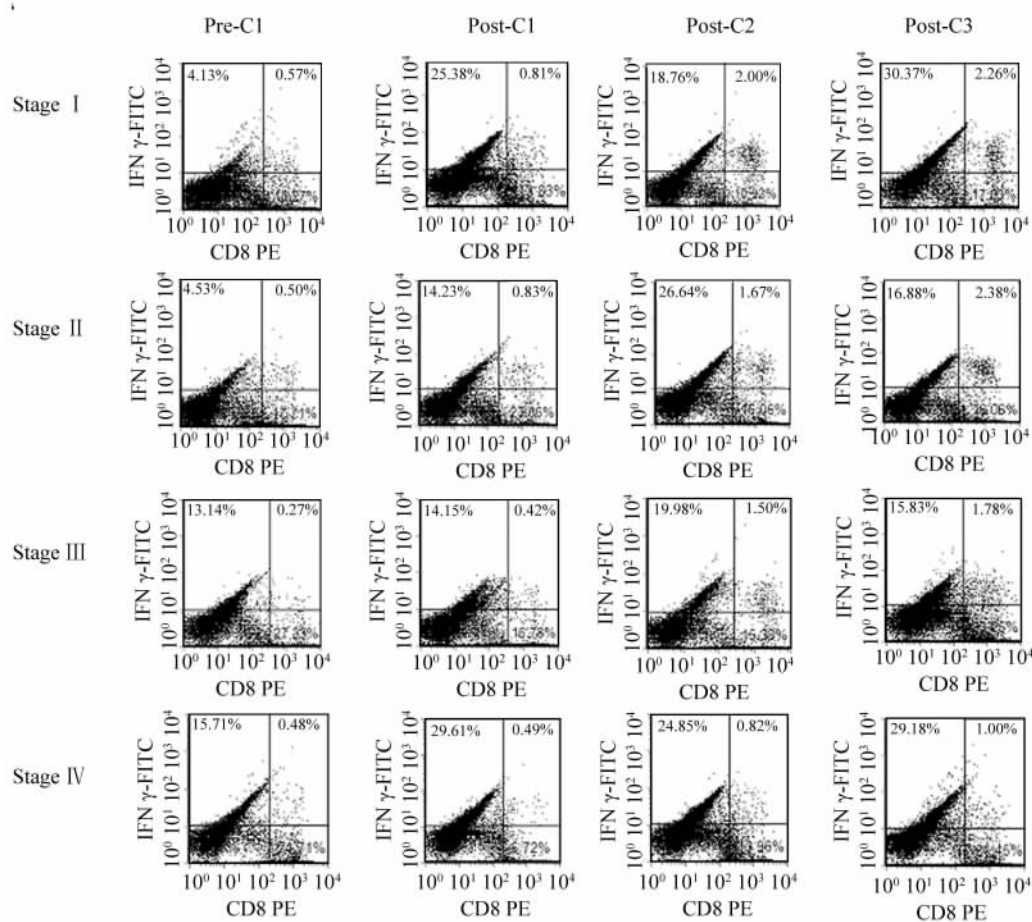


图 1 I ~ IV 期 TNBC 患者 DC 治疗前和治疗 1 ~ 3 个疗程后的 CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平  
Fig. 1 Levels of CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> T lymphocytes from TNBC patients of stage I to stage IV before ( pre-C1 ) and after DC vaccinations( Post-C1, C2, C3 )

表 4 不同分期 TNBC 患者 1 ~ 3 疗程 DC 免疫治疗后 DTH 试验阳性率比较 [ n ( % ) ]

Tab. 4 DTH positive rates of all stages of TNBC patients after one to three cycles of DC vaccination [ n ( % ) ]

Stage	N	Cycles		
		1	2	3
I	21	9( 42.86 ) <sup>Δ</sup>	11( 52.38 ) <sup>*Δ</sup>	14( 66.67 ) <sup>*Δ</sup>
II	44	19( 43.18 ) <sup>Δ</sup>	20( 45.45 ) <sup>*Δ</sup>	31( 70.45 ) <sup>*Δ</sup>
III	21	6( 28.57 ) <sup>Δ</sup>	9( 42.86 ) <sup>*Δ</sup>	12( 57.14 ) <sup>*Δ</sup>
IV	26	2( 7.69 )	4( 15.38 ) <sup>*</sup>	6( 23.08 ) <sup>*</sup>

\* P < 0.05 vs cycle 1; <sup>Δ</sup> P < 0.05 vs stage IV stage

研究发现,各期 TNBC 患者对 DC 的免疫应答水平不尽相同。I ~ III 期 TNBC 患者在第 1 疗程后,外周血清中 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 水平即明显提高,呈 Th1 型免疫应答,并能保持较长时间的高水平状态,但 IV 期 TNBC 患者即使在 3 个疗程 DC 治疗后,各种细胞因子水平均未见明显变化。众所周知, Th1 型细胞因子在激发机体固有免疫和获得性免疫中发挥重要作用<sup>[31-32]</sup>。本研究结果表明,负载自体热休克凋亡癌细胞抗原的 DC 可以高效地激发早中期 TNBC 患者产生 Th1 型非特异性免疫反应。

CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)是 DC 疫苗致敏激活的关键效应细胞。研究结果显示,至少 3 个疗程才能激活相对明显的肿瘤抗原特异性 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CTLs,其在外周血中的比例或数量随着 DC 免疫次数的增加而不断被扩增。DTH 试验发现, DTH 阳性率与 DC 免疫次数成正相关,这与 CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CTLs 的变化趋势是一致的;早、中期患者 DTH 阳性率显著高于晚期患者。综合这两项结果表明,负载热休克细胞抗原的自体 DC 不仅可以激发 TNBC 患者产生 Th1 型非特异性免疫应答,而且还可以诱导特异性 CD8<sup>+</sup> CTL 免疫反应。对于晚期 TNBC 患者,可能需要更多疗程的刺激去打破其免疫耐受状态或重建免疫平衡后才能产生特异性 CTL 免疫应答。

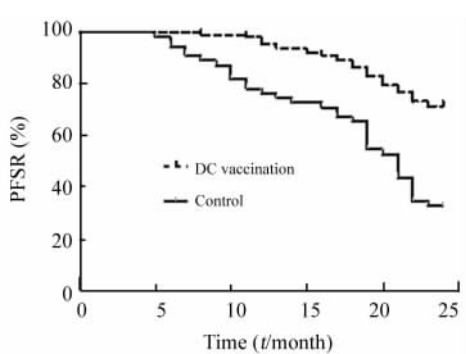


图 2 DC 疫苗治疗后 III 期和 IV 期 TNBC 患者与对照组患者 PFSR 的比较

Fig. 2 Comparison of the PFSRs between the stage III and IV TNBS patients and corresponding controls after treatment with DC vaccine

TNBC patients were followed up for 2 years after finishing three cycles of DC vaccination. The PFSR in stage III to stage IV TNBC patients was 71.43%, much higher than that in corresponding controls (32.73%,  $P < 0.01$ )

尽管不少研究小组的 DC 免疫临床疗效与实验室效果存在差距,但本研究 2 年随访结果表明,DC 免疫可以抑制中、晚期 TNBC 患者肿瘤的进展,显著提高晚期 TNBC 患者的无进展生存率,改善患者生活质量。结果还发现,DTH 阳性患者的 DPT 和 PFSR 均高于 DTH 阴性患者,说明 DTH 试验可以作为评价 DC 治疗疗效的指标之一。

本研究 DC 疫苗制备体系的优势可能对本研究结果进行更好的解释。先前已报道<sup>[14]</sup>,热休克可快速提升瘤细胞内多种热激蛋白(HSP)的表达水平,体外 3 次 DC 免疫即可激发 CD8<sup>+</sup> CTL。HSP 是已

知的天然免疫佐剂、分子伴侣,在多肽转运中发挥重要作用<sup>[33-34]</sup>。因此,在本研究的免疫体系中含有 DC 和 HSP 两种天然免疫佐剂,这将有助于提高疫苗的免疫效能。研究<sup>[35]</sup>报道,DC 表达 HSP70 受体,DC 可借助受体介导的内吞机制高效捕获热休克肿瘤细胞抗原,提高抗原负载效率。与细胞裂解液或特定多肽、蛋白等抗原形式比较,热休克肿瘤细胞具有抗原谱广(已知与未知)的优势,利用 DC 专职抗原提呈功能,可诱导多克隆 CD4<sup>+</sup> CTL 和 CD8<sup>+</sup> CTL,从而建立更为稳固的特异性细胞免疫应答。

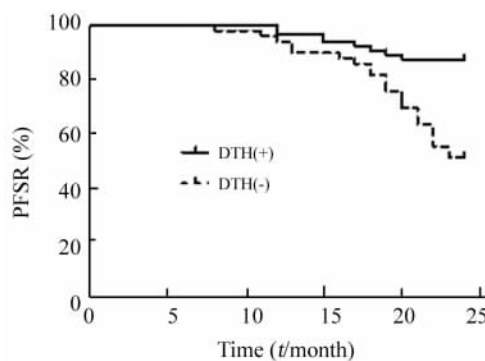


图 3 DTH 阳性 TNBC 患者与 DTH 试验阴性患者 PFSR 比较

Fig. 3 Comparison of PFSRs between the DTH test positive TNBC patients and the DTH test negative patients

The PFSR in stage I to stage IV TNBC patients with DTH test positive was 87.30%, much higher than that in the DTH test negative patients (51.02%,  $P < 0.01$ )

总之,本研究提示,对 TNBC 患者而言,负载自体热休克细胞抗原的自体 DC 疫苗是一种安全的治疗方法。对于早中期 TNBC 患者能明显激发患者的免疫应答,但是对于晚期患者免疫激发能力相对较弱。今后将在 DC 疫苗制备工艺的改良、提高疫苗的效能上进一步研究,同时在 DC 疫苗的临床应用上,如何与常规的化疗、内分泌治疗和放疗有机结合,以寻找最佳治疗时机也是未来的研究方向。

[参考文献]

[1] 徐光炜,胡永昇,阚秀. 中国 10 万妇女乳腺癌筛查初探[J]. 中国肿瘤, 2010, 19(9): 565-568.  
 [2] Morrison DH, Rahardja D, King E, et al. Tumor biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer [J]. Br J Cancer, 2012, 107(2): 382-387.  
 [3] Obiorah I, Jordan VC. Progress in endocrine approaches to the treatment and prevention of breast cancer [J]. Maturitas, 2011, 70(4): 315-321.

- [ 4 ] Wong AL, Lee SC. Mechanisms of resistance to Trastuzumab and novel therapeutic strategies in Her2-positive breast cancer [ J ]. *Int J Breast Cancer*, 2012, Article ID415170, 13pages.
- [ 5 ] de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer [ J ]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137( 2 ): 183-192.
- [ 6 ] 洪勇. 三阴性乳腺癌研究进展 [ J ]. *中国肿瘤临床与康复*, 2012, 19( 1 ): 92-93.
- [ 7 ] 陈虎, 唐晓义, 张斌. 树突状细胞肿瘤疫苗: 全球临床试验巡礼 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19( 1 ): 1-10.
- [ 8 ] Palucka K, Ueno H, Fay J, et al. Dendritic cells and immunity against cancer [ J ]. *J Intern Med*, 2011, 269( 1 ): 64-73.
- [ 9 ] Jähnisch H, Füssel S, Kiessling A, et al. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer [ J/OL ]. *Clin Dev Immunol*, 2010, doi: 10.1155/2010/517493.
- [ 10 ] Franks HA, Wang Q, Patel PM. New anticancer immunotherapies [ J ]. *Anticancer Res*, 2012, 32( 7 ): 2439-2453.
- [ 11 ] Yamanaka R, Kajiwara K. Dendritic cell vaccines [ J ]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 746( 4 ): 187-200.
- [ 12 ] 刘洋, 曹雪涛. 免疫佐剂研发和临床转化的现状与发展趋势 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21( 2 ): 192-202.
- [ 13 ] Paczesny S, Shi H, Saito H, et al. Measuring melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes elicited by dendritic cell vaccine with a tumor inhibition assay in vitro [ J ]. *J Immunother*, 2005, 28( 2 ): 148-57.
- [ 14 ] Shi H, Cao T, Connolly JE, et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 4 ): 2134-2141.
- [ 15 ] 朱玉兰, 钱科卿, 秦建伟, 等. 乳腺癌细胞抗原负载的自体树突状细胞体内诱导特异性 T 细胞应答 [ J ]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27( 6 ): 708-710.
- [ 16 ] Nofech Mozes S, Vella ET, Dhesy Thind S, et al. Systematic review on hormone receptor testing in the breast cancer [ J ]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012, 20( 3 ): 214-263.
- [ 17 ] Oktay MH, Gertler FB, Liu YF, et al. Correlated immunohistochemical and cytological assays for the prediction of hematogenous dissemination of breast cancer [ J ]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60( 3 ): 168-173.
- [ 18 ] Strehl JD, Wachter DL, Fasching PA, et al. Invasive breast cancer: Recognition of molecular subtypes [ J ]. *Breast Care*, 2011, 6( 4 ): 258-264.
- [ 19 ] Leong AS, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment [ J ]. *Pathobiology*, 2011, 78( 2 ): 99-114.
- [ 20 ] Saxena R, Dwivedi A. ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: Current status and future clinical perspective [ J ]. *Med Res Rev*, 2012, 32( 1 ): 166-215.
- [ 21 ] Voon PJ, Kong HL. Tumor genetics and genomics to personalize cancer treatment [ J ]. *Ann Acad Med Singapore*, 2011, 40( 8 ): 362-368.
- [ 22 ] Howe LR, Brown PH. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer [ J ]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4( 8 ): 1149-1157.
- [ 23 ] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12( 4 ): 265-277.
- [ 24 ] Turnis ME, Rooney CM. Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer [ J ]. *Immunotherapy*, 2010, 2( 6 ): 847-862.
- [ 25 ] Palucka K, Ueno H, Robert L, et al. Dendritic cells: Are they clinically relevant? [ J ]. *Cancer J*, 2010, 16( 4 ): 318-324.
- [ 26 ] Benencia F, Sprague L, McGinty J, et al. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination [ J/OL ]. *J Biomed Biotechnol*, 2012: e425476.
- [ 27 ] Kalantari T, Kanmali-Sarvestani E, Ciric B, et al. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells [ J ]. *Immunol Res*, 2011, 51( 2/3 ): 153-160.
- [ 28 ] Dees EC, Mckinnon KP, Kuhns JJ. Dendritic cells can be rapidly expanded ex vivo and safely administered in patients with metastatic breast cancer [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53( 9 ): 777-785.
- [ 29 ] Sharma A, Koldovsky U, Xu S, et al. HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ [ J ]. *Cancer*, 2012, 118( 7 ): 4354-4362.
- [ 30 ] Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, et al. Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin [ J ]. *Int J Mol Med*, 2003, 12( 4 ): 493-502.
- [ 31 ] Sheu BC, Lin RH, Lien HC, et al. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer [ J ]. *J Immunol*, 2001, 167( 5 ): 2972-2978.
- [ 32 ] Elsasser-Beile U, Geierschner D, Jantschke P, et al. Different basal expression of type T1 and T2 cytokines in peripheral lymphocytes of patients with adenocarcinomas and benign hyperplasia of the prostate [ J ]. *Anticancer Res*, 2003, 23( 5A ): 4027-4031.
- [ 33 ] Ciocca DR, Cayado-Guiterrez N, Maccioni M, et al. Heat shock proteins( HSPs ) based anti-cancer vaccines [ J ]. *Curr Mol Med*, 2012, 12( 9 ): 1183-1197.
- [ 34 ] Murshid A, Gong J, Calderwood SK. The role of heat shock proteins in antigen cross presentation [ J ]. *Front Immunol*, 2012, 3( 1 ): 63-88.
- [ 35 ] Zitzler S, Hellwig A, Hartl FU, et al. Distinct binding sites for the ATPase and substrate-binding domain of human HSP70 on the cell surface of antigen presenting cells [ J ]. *Mol Immunol*, 2008, 45( 15 ): 3974-3983.

[ 收稿日期 ] 2014 - 02 - 25 [ 修回日期 ] 2014 - 04 - 05

[ 本文编辑 ] 韩丹

欢迎访问《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 [www.biother.org](http://www.biother.org)