

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.016

DC 诱导 CTL 治疗 HPV 感染宫颈癌患者的疗效观察

王丹红, 张斌, 高海燕, 丁国梁, 陈虎(军事医学科学院附属 307 医院 全军造血干细胞移植研究所, 北京 100071)

[摘要] **目的:**评价 DC 诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)治疗人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染的 8 例宫颈癌(cervical cancer, CC)患者的临床疗效及安全性。**方法:**收集 2010 年 11 月至 2012 年 5 月在本院采用 CTL 细胞治疗 HPV 阳性的 CC 患者 8 例, 采集 CC 患者外周血单个核细胞, 以重组腺病毒介导 HPV16/18 E6/E7 转染 DC 细胞并诱导产生的 CTL 回输给患者, 每次回输细胞量为 1×10^9 个, 每 2 周回输一次, 6 次为一疗程。随访 6 ~ 27 个月, 观察患者临床疗效和安全性。**结果:** CTL 细胞治疗的 8 例 HPV 感染的 CC 患者 5 例 HPV 转为阴性; 其中治疗前缓解以及稳定状态的 6 例患者经 CTL 治疗后 5 例转为阴性, 治疗前进展状态的 2 例患者无效; 1 例处于部分缓解状态的 CC 患者经 CTL 细胞治疗后达到完全缓解状态。全部治疗患者均无明显的不良反应。**结论:** CTL 细胞治疗 HPV 感染 CC 患者 HPV 感染转阴率高、可减缓病情进展且安全, 更重要的是 CTL 细胞治疗为处于缓解以及稳定状态的 HPV 感染的 CC 患者提供了一条新的治疗途径。

[关键词] 细胞毒性 T 淋巴细胞; 宫颈癌; 临床疗效

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0570-04

Efficacy and safety of dendritic cell-induced cytotoxic T lymphocytes in the treatment of patients with HPV-positive cervical cancer

Wang Danhong, Zhang Bin, Gao Haiyan, Ding Guoliang, Chen Hu(Research Institution of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, No. 307 Hospital Affiliated to Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the efficacy and safety of dendritic cell (DC)-induced cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the treatment of patients with HPV-positive cervical cancer (CC). **Method:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from 8 HPV-infection CC patients who were admitted to our institute between November, 2010 and May, 2012. CTLs were generated by infecting the isolated PBMCs with adenoviral vector carrying HPV16/18 E6/E7 together with sequential stimulations with GM-CSF IL-4, TNF- α , IL-2 and IL-7 for once two weeks as an infusion. Patients were each treated with their own adenovirus-infected DC-CTLs through intravenous infusion twice a week for 3 weeks. Follow-up was performed for 6–27 months, during which patients' response and adverse events were assessed. **Result:** Out of the 6 patients with partial remission/stable disease prior to treatment, 5 became HPV-negative. Adenovirus-infected DC-CTLs resulted in complete remission in 1 patient with partial remission prior to treatment but showed little effect in the 2 patients with a progressive disease prior to treatment. No significant adverse events were observed in any of the patients. **Conclusion:** Autologous transfusion of CTLs induced by DCs overexpressing HPV16/18 E6/E7 may offer a novel efficient and safe treatment for HPV-positive CC patients under a partial remission/stable disease state.

[Key words] cytotoxic T lymphocyte; cervical cancer; clinical efficacy

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 570-573]

[基金项目] 国家科技重大专项“十二五”计划基金资助项目(No. 2009zx09503)。Project supported by the Major Science and Technology Foundation of “Twelve Five-year Plan” of China(No. 2009zx09503)

[作者简介] 王丹红(1966 -), 女, 吉林省长春市人, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事血液病以及肿瘤免疫治疗研究, E-mail: wangdh307@sina.com

[通信作者] 陈虎(Chen Hu, corresponding author), E-mail: chenhu217@aliyun.com

宫颈癌,即子宫颈癌(cervical cancer,CC),是全球女性中仅次于乳腺癌最常见的妇科恶性肿瘤之一^[1]。根据国际癌症研究中心报告,在全球范围内,每年约有50万妇女被诊断患CC,约有28.8万患者病死,其中78%的病例发生在发展中国家^[2]。在CC的治疗中早期以手术为主,中晚期以放射治疗为主,总的5年生存率为50%左右。尽管多年来不断改进手术和放射治疗手段,但治疗后的CC患者仍具有35%的复发率^[3]。究其原因,主要与手术和放疗均为局部治疗手段,而且难以清除微小转移病灶。在CC的患者中,将近90%是由人乳头状瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染引起的,且HPV感染与CC的发生、发展密切相关。因此,寻找新的治疗手段成为治疗HPV感染的CC患者的紧迫需求。重组腺病毒载体编码基因修饰的树突状细胞(dendritic cell,DC)疫苗,可以有效诱导细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)的生成,更重要的是可以特异性地杀伤残留的肿瘤细胞^[4],而且细胞免疫治疗具有低毒和疗效好的特点,因而有着巨大的临床研究应用前景。为了增加对CC细胞有反应的潜在T细胞的数量,进一步改善客观临床反应,本实验采用重组腺病毒载体编码的HPV16/18 E6/E7基因转染DC细胞诱导生成的CTL对8例HPV感染的CC患者进行免疫治疗,评价该CTL细胞对HPV感染CC患者免疫治疗的有效性及其安全性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2010年11月至2012年5月在本院采用CTL细胞治疗HPV阳性的CC患者8例,年龄37~71岁,中位年龄44岁;患者入组之前,其中处于CR状态的患者4例,处于PR状态的患者1例,SD状态的患者为1例,PD状态的患者为2例。(1)入选标准:明确诊断为CC;细胞治疗前均接受过CC的常规规范化治疗(包括手术、放疗和/或化疗等);确诊时及细胞治疗前检测HPV持续为HPV16/18阳性者;末次治疗至开始接受CTL细胞免疫治疗的间隔时间 ≥ 4 周;患者预期生存 > 3 个月;KPS评分 > 60 分;无严重的病毒、细菌感染。(2)排除标准:正在接受放疗、化疗或其他全身抗肿瘤治疗者;同时存在其他恶性肿瘤及传染性疾病者;大手术伤口未完全愈合者;怀孕期或哺乳期妇女;存在违反本治疗的体检或实验室异常者;对生物制品过敏反应者。本临床试验经医院伦理委员会审查批准,全部入组患

者均签署知情同意书,同意进行此免疫治疗。患者一般资料见表1。

1.2 CTL细胞培养

通过费森尤斯细胞分离机无菌采集肿瘤患者抗凝全血50~60 ml,将 $(8 \sim 12) \times 10^7$ 个细胞种入10 cm²的培养皿中,同时添加5 ml培养液放入培养箱中,贴壁30 min;取出培养皿,将悬浮细胞转移至培养瓶中,用生理盐水反复滴洗培养皿,直至无悬浮细胞,继而将重组腺病毒载体编码的HPV16/18 E6/E7基因转染DC,同时加入包含GM-CSF的培养基,每皿加入4 ml,放入培养箱中培养;时间定为第0天(简称“AAV-DC-CTL治疗”);然后在第1、5天分别加入含IL-4、TNF- α 的培养基,于第6天收集平皿中的DC细胞和培养瓶培养的单核细胞,按照1:20~60的比例混合,加入含GM-CSF和IL-2、IL-7的培养基,置5% CO₂培养箱中培养,然后于第14天收集CTL细胞。

1.3 CTL治疗方案

采集并培养细胞当日计为第0天,第14天收集CTL并静脉回输细胞悬液(回输细胞数为 1×10^9 个)。于回输当日回输前行第二次采集细胞并行CTL培养,一次连续6次细胞治疗(共需12周)为一疗程。

1.4 疗效评价

8例HPV感染的宫颈癌患者在CTL细胞免疫治疗1疗程(3个月)后检测HPV的变化情况,同时按RECIST标准进行原发灶和/或转移灶的CT或核磁共振等检查评估疗效。之后每3~6个月复查1次。中位随访时间6~27个月。

1.5 安全性评价

观察患者治疗前后血常规、肝肾功的变化,以及治疗过程中所出现的不良反应,如有无发热、皮疹、呕吐、腹泻等不良反应。

2 结果

2.1 HPV感染的CC患者CTL治疗的疗效评价

8例HPV阳性的CC患者,在细胞免疫治疗完成1疗程后的HPV的检测结果显示,其中6例处于缓解及稳定状态的HPV感染的患者,经CTL免疫治疗后,5例HPV感染的患者转阴;处于进展状态且HPV感染的2例患者,经CTL免疫治疗后,HPV感染状况未改善。

2.2 安全性

8例宫颈癌患者治疗前后血常规、肝肾功无明显变化,治疗过程中8例患者均未出现发热和寒颤

等相关毒副作用。

表 1 8 例 HPV 感染的宫颈癌患者 CTL 治疗后疗效评价

Tab. 1 Therapeutic efficacy evaluation for 8 patients with HPV infection after treatment with CTL

No	Age	Stage	Previous therapy	Therapeutic efficacy evaluation		HPV infection	
				Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
1	55	I	Radiotherapy, chemotherapy and hyperthermia	CR	CR	Positive	Positive
2	45	IV	Radiotherapy and chemotherapy	CR	CR	Positive	Negative
3	53	I	Surgery, chemotherapy and radiotherapy	CR	CR	Positive	Negative
4	40	II	Surgery and radiotherapy	CR	CR	Positive	Negative
5	42	IV	Surgery and radiotherapy	PR	CR	Positive	Negative
6	71	IV	Surgery, chemotherapy and radiotherapy	SD	SD	Positive	Negative
7	58	IV	Interventional treatment, chemotherapy and radiotherapy	PD	PD	Positive	Positive
8	37	IV	Surgery, chemotherapy and radiotherapy	PD	PD	Positive	Positive

3 讨论

虽然预防性疫苗的成功商业化是控制 CC 和其他可能与 HPV 相关恶性肿瘤的一个重要里程碑,但是仍然迫切需要治疗性 HPV 疫苗。第一、在世界范围内存在大量 HPV 感染人群,因为一些已经发生病毒整合的 HPV 相关肿瘤细胞不表达可检测水平的衣壳抗原(L1 及/或 L2),所以预防性 HPV 疫苗不能有效清除这些 HPV。第二、现有预防 HPV 疫苗的高成本,可能限制了它们在发展中国家的使用,这些国家医疗资源有限。第三、由于现存 HPV 感染人群癌变的缓慢进展,预计从预防性疫苗接种到影响 CC 发生率大约需要 20 年^[5]。所以,为了促进 HPV 相关恶性肿瘤和其前期病变死亡率和发病率的下降,继续开发抗 HPV 治疗性疫苗是很重要的。所以,目前治疗性疫苗的发展一直是一个热点。HPV 的感染成为 CC 发生、发展中最主要的风险因素,但是在 CC 的病变部位,HPV E6 和 E7 蛋白处于恒定的高表达状态^[6],正是 E6 和 E7 蛋白高表达的特征^[7]为 CC 免疫治疗特异性靶向抗原提供了选择优势,鉴于此,许多治疗性疫苗策略主要集中于刺激生成和激活能识别表达靶标抗原 E6 和 E7 感染细胞的 T 细胞。DC 最突出的特点之一是能够刺激初始 T 细胞 (naive T cell) 增殖,激发有效的免疫反应,尤其是 Th1 免疫反应^[8]。在携带抗原基因的病毒载体转染 DC 的研究中,DC 疫苗可有效诱导细胞毒性 T 淋巴

细胞的生成,特异性杀伤机体多处部位的 HPV 感染细胞或者 HPV 相关肿瘤细胞,且不对正常组织造成重大损伤。将 HPV-16 及-18 的 E7 蛋白负载到自体 DC 制备治疗性细胞疫苗,用于常规治疗难以控制的复发性或转移性 CC 患者,所有患者对此疫苗的耐受性良好,未观察到局部或全身性毒性反应^[9-10]。

本研究采用重组腺病毒载体构建表达 E6 及 E7 基因的表达载体对 DC 进行了有效的基因转染,在体外成功诱导特异性的 CTL 的生成。8 例 HPV 阳性的宫颈癌患者接受 CTL 细胞免疫治疗后,处于缓解稳定状态 HPV 感染 6 例患者,有 5 例 HPV 感染患者转阴,而处于进展状态的 2 例患者依然处于 HPV 感染状态;患者未出现明显不良反应,部分患者生活质量得到明显改善。

多位学者^[11]对 HPV 与 CC 的临床进展以及预后相关性的 10 年回顾分析,HPV 与 CC 的组织类型以及血管浸润具有相关性,单变量分析显示,HPV 与 CC 的预后具有显著相关性,该研究结果也间接证明了 CTL 细胞治疗对 HPV 感染 CC 的预后有着重要的临床意义。通过本研究的结果以及其他相关研究结果,可以得出一个主要结论:CTL 免疫治疗的临床受益率更倾向于那些处于缓解以及稳定状态的 HPV 感染患者。该结论可以为以后的临床治疗对象选择提供了标准。但是本研究为回顾性病例分析,入组患者较少,研究存在着较多的局限性。

[参考文献]

- [1] Conesa-Zamora P. Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: Treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(2): 480-488.
- [2] Haar C, Swift S. The prevention of cervical cancer in developing nations [J]. *J S C Med Assoc*, 2013, 109(4): 132-134.
- [3] Bellone S, Pecorelli S, Cannon MJ, et al. Advances in dendritic-cell-based therapeutic vaccines for cervical cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7(10): 1473-1486.
- [4] Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(8): 591-600.
- [5] Barbara Ma, Yijie Xu, Chien-Fu Hung, et al. HPV and therapeutic vaccines: Where are we in 2010? [J]. *Curr Cancer Ther Rev*, 2010, 6(2): 81-103.
- [6] Cañadas MP, Darwich L, Sirera G, et al. Human papillomavirus 16 integration and risk factors associated in anal samples of HIV-1 infected men [J]. *Sex Transm Dis*, 2010, 37(5): 311-315.
- [7] Wentzensen N, Follansbee S, Borgonovo S, et al. Human papillomavirus genotyping, human papillomavirus mRNA expression and p16/Ki-67 cytology to detect anal cancer precursors in HIV-infected MSM [J]. *AIDS*, 2012, 26(17): 2185-2192.
- [8] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 265-277.
- [9] Santin AD, Bellone S, Palmieri M, et al. HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(3): 469-478.
- [10] Monahan PE, Jooss K, Sands MS. Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: A current evaluation [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2002, 1(1): 79-91.
- [11] Pilch H, Günzel S, Schäffer U, et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: Correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the department of obstetrics and gynecology of the mainz university [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, 11(1): 39-48.

[收稿日期] 2014 - 05 - 21

[修回日期] 2014 - 07 - 27

[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公共利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 www.chictr.org, 公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

(本刊编辑部)