

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.008

· 临床研究 ·

DC-CIK 细胞治疗中晚期食道癌的临床疗效

王丹红, 张斌, 高海燕, 丁国梁, 陈虎(军事医学科学院附属医院造血干细胞移植科, 北京 100071)

[摘要] **目的:**评价重组腺病毒载体编码基因修饰的自体树突状细胞(dendritic cell, DC)联合细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞(DC-CIK)治疗中晚期食道癌的临床疗效和安全性及其对食道癌患者外周血淋巴细胞亚群的影响。**方法:**采集2011年5月至2013年5月解放军第307医院收治的20例中晚期食道癌患者的PBMC,经实验室的体外培养诱导产生CIK细胞和DC,并将重组腺病毒载体编码的*survivin*和*muc-1*基因转染DC。采集PBMC后第7、9、11、13天给患者皮下注射 $(3 \sim 10) \times 10^7$ 个DC(1 ml),第11、13天静脉回输 $(2 \sim 15) \times 10^9$ 个CIK细胞(100 ml),每疗程间隔3个月,直至疾病进展,观察临床疗效和不良反应。分别于免疫治疗前1周和每疗程完成后的1个月取患者外周血,流式细胞术检测淋巴细胞亚群变化。**结果:**20例中晚期食道癌患者经DC-CIK治疗后,1例CR、6例PR、6例SD、7例PD;客观反应率为35%,疾病控制率为65%;经细胞免疫治疗后Th1 $[(14.5 \pm 13.3)\% \text{ vs } (3.6 \pm 5.9)\%, P < 0.05]$ 、Th2 $[(1.0 \pm 0.7)\% \text{ vs } (0.6 \pm 0.5)\%, P < 0.05]$ 细胞比例显著增加。治疗过程中20例患者均未出现发热和寒颤等相关不良反应。**结论:**DC-CIK细胞免疫治疗可改善中晚期食道癌患者的免疫抑制状态,提高患者的抗肿瘤免疫效应,无明显不良反应。

[关键词] 树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;食道癌;临床疗效;安全性

[中图分类号] R735.1; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0647-05

Dendritic cells in combination with cytokine-induced killer cells in the treatment of stage II-IV esophageal cancer

Wang Danhong, Zhang Bin, Gao Haiyan, Ding Guoliang, Chen Hu (Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the safety and clinical efficacy of dendritic cells (DCs) combined with cytokine-induced killer (CIK) cells in the treatment of esophagus cancer and its effect on the lymphocyte subsets of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Methods:** PBMCs were collected from 20 patients with stage II-IV esophagus cancer who were admitted to the Academy of Military Medical Sciences-Affiliated Hospital in Beijing between May 2011 and May 2013. Non-adherent PBMCs were induced to develop into CIK cells by IFN- γ , IL-2 500 U/ml and Anti-CD3 and adherent PBMCs were induced to develop into DCs by TNF- α , followed by transfection with *surviving* and *muc-1*. On days 7, 9, 11, and 13, respectively, after PBMCs collection, DCs $(3 - 10) \times 10^7$ in 1 ml PBS were given subcutaneously and days 11 and 13 CIK cells $(2 - 15) \times 10^9$ in 100 ml PBS. This treatment regimen was repeated at an interval of 3 months until substantial remission was achieved. Clinical outcomes and adverse effects were recorded during the treatment period. One week before treatment and one month after each treatment cycle, peripheral blood was collected and lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry. **Results:** Complete remission occurred in one case and partial remission in 6 cases while the disease remained at a stable state in 6 cases and at a progressive state in 7 cases after treatment. The overall response rate was 35% and the disease control rate was 65%. Treatment with CIKs and DCs significantly increased the percentage of both Th1 $[(14.5 \pm 13.3)\% \text{ vs } (3.6 \pm 5.9)\%]$ and Th2 $[(1.0 \pm 0.7)\% \text{ vs } (0.6 \pm 0.5)\%]$ as compared with the vehicle control ($P < 0.05$). No evident adverse events were observed. **Conclusion:** Infusion of DCs and CIK cells may im-

[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,吉林长春人,硕士,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

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1513.006.html>

prove the immunosuppression status and enhance the anti-tumor immunity in patients with stage II-IV esophagus cancer, thereby having potential clinical implications.

[**Key words**] dendritic cell (DC); cytokine-induced killer (CIK) cell; esophageal cancer; clinical efficacy; safty
[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 647-651]

据国际癌症研究中心^[1]报告,在全球范围内,每年约有 33 万人被诊断为食道癌,病死率将近 83.6%。在我国,食道癌的年发病人数为 17.6 万,占全球食道癌发病人数的 53.3%。但目前食道癌的治疗方法仅可减轻患者的临床症状,整体预后较差^[2],究其原因,主要是手术和放疗等均为局部治疗手段,难以清除微小转移病灶。因此,寻找新的治疗方法成为治疗食道癌的必然趋势。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 lymphocyte, CTL)的生成,特异性杀伤残留的肿瘤细胞^[3];细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是一种体外增殖能力强、杀瘤活性高的广谱抗癌免疫活性细胞^[4]。本研究通过重组腺病毒载体编码基因修饰的 DC 疫苗联合 CIK 细胞治疗中晚期食道癌患者 20 例,回顾性评价 DC-CIK 细胞免疫治疗对中晚期食道癌患者治疗的安全性及有效性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2011 年 5 月至 2013 年 5 月在军事医学科学院附属 307 医院造血干细胞移植科采用 DC-CIK 细胞治疗的可评估的中晚期食道癌患者 20 例,年龄 37 ~ 78 岁,中位年龄 58 岁; KPS 评分 70 ~ 90 分。(1)入选标准:组织学或细胞学明确诊断为中晚期食道癌;接受过食道癌的规范化治疗(包括手术、放疗和化疗);末次治疗至开始接受 DC-CIK 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;无严重的病毒或细菌感染。(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;对生物制品过敏者。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。患者一般资料见表 1。

表 1 20 例食道癌患者的一般资料

Tab.1 Demographic and clinical features of 20 patients with esophagus cancer

Sex	Age	Pathologic type	Stages	Past treatment	Sites of metastatic	Curative effect of the cellular therapy
Male	51	SCC	3	Surgery + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	SD
Male	51	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Liver	PR
Female	78	SCC	2	No	Primary tumor	SD
Male	46	SCC	3	Radiation therapy	Peripheral lymph Nodes	CR
Male	48	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Bone	PD
Male	64	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Gastric	PR
Male	56	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Lung	PD
Male	72	SCC	4	Chemotherapy	Lung	PD
Male	71	SCC	3	Radiotherapy	Primary tumor	SD
Male	51	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Liver	PD
Male	58	SCC	3	Surgery + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	PR
Male	50	SCC	2	Surgery + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	SD
Female	71	SCC	2	Radiotherapy	Primary tumor	PR
Male	63	SCC	3	Radiotherapy + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	SD
Male	49	SCC	3	Radiotherapy + Chemotherapy	Primary tumor	PD
Male	67	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Lung	PR
Male	67	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Lung	PD
Male	59	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Gastric	PD
Male	37	SCC	4	Surgery + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	SD
Female	58	SCC	3	Surgery + Chemotherapy	Peripheral lymph nodes	PR

SCC: Squamous cell carcinoma

1.2 主要试剂与仪器

细胞培养箱、A2 生物安全柜购自美国 Thermo 公司, FACS Van-tage SE 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。GT-T551 购自日本 TaKaRa 公司, 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技公司, 人血清白蛋白购自奥地利 Baxter AG 公司。临床使用标准 Cat LTS1077、rGM-CSF 及 rIL-4 购自厦门特宝生物工程公司。

1.3 DC-CIK 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血 50 ~ 60 ml, 加淋巴细胞分离液制备 PBMC, 按照 $(8 \sim 12) \times 10^7$ 的细胞密度接种入 75 cm^2 的培养瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 贴壁培养 30 min; 取出培养瓶, 将悬浮细胞按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度种于培养袋, 加入 IFN- γ 100 ng/ml、IL-2 500 U/ml, 第 2 天加入 50 ng/ml Anti-CD3 单抗, 保持细胞密度在 $(1 \sim 2) \times 10^6/\text{ml}$, 于第 10 天至 11 天收集 CIK 细胞; 贴壁细胞加入 GM-CSF 1 000 U/ml、IL-4 500 U/ml, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中, 饱和湿度条件下培养 4 d 换液, 再加入 TNF- α 100 ng/ml 继续培养 3 d, 于第 6 天将重组腺病毒载体编码的 survivin 和 muc-1 基因转染 DC, 在第 7 天收获成熟的 DC 疫苗。

1.4 DC-CIK 治疗方案

采集 PBMC 当日计为第 0 天, 第 7、9、11、13 天分 6 点皮下注射 1 ml DC 细胞液, 注射部位分别为双侧锁骨下、双侧腋下、双侧腹股沟区, 总细胞计数为 $(3 \sim 10) \times 10^7$ 个; 第 11、13 天静脉回输 100 ml CIK 细胞悬液, 总细胞计数为 $(2 \sim 15) \times 10^9$ 。每疗程间隔 3 个月, 直至疾病进展。

1.5 疗效评价

临床疗效按 RECIST 标准分为 CR、PR、SD、PD。以 CR + PR 计算客观缓解率 (objective response rate, ORR), CR + PR + SD 计算疾病控制率 (disease control rate, DCR)。患者接受免疫治疗后的 1 个月进行原发灶及转移灶的 CT 扫描等检查评估疾病状态, 治疗后 3 个月再次评估疾病状态, 之后每 3 ~ 6 个月复查 1 次。分析患者接受 DC-CIK 细胞免疫治疗后 ORR 及 DCR, 若患者出现异常症状和体征, 随时进行随访复查。不良反应按 WHO (1998) 统一标准进行评价, 分为 0 ~ IV 度。

1.6 流式细胞术检测 DC-CIK 治疗对患者淋巴细胞亚群的影响

分别于每疗程 DC-CIK 细胞治疗前 1 周和每次治疗后 1 个月抽取患者外周血 2 ml (抗凝血), 流式细胞术检测患者外周血淋巴细胞免疫功能指标

CD3⁺CD4⁺CD8⁻、CD3⁺CD4⁻CD8⁺、CD3⁺CD19⁻、Th1、Th2 细胞的动态变化, 其中以 CD4 单抗设门圈出 CD4⁺T 细胞群, 然后分别以 INF- γ 、IL-4 标记 Th1 和 Th2 细胞。

1.7 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。

1.8 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS16.0 统计学软件进行数据处理。所有数据进行正态性检验, 符合正态分布, 采用配对 *t* 检验; 不符合正态分布, 采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

20 例食道癌患者, 中位随访时间 3 ~ 24 个月, 经 DC-CIK 免疫治疗后, CR 1 例, PR 6 例, SD 6 例, PD 7 例; DC-CIK 免疫治疗后 ORR 为 35%, 疾病控制率 DCR 为 65%, 见表 1。临床研究结果显示, 其中 1 例食道癌患者, 通过影像学的检测与治疗前相比较; 治疗前病灶大小为 $2.3 \times 3.8 \text{ cm}$, 伴多发淋巴结肿大; 治疗后原病灶及淋巴结明显缩小, 未见异常高代谢肿瘤残余征象, 见图 1。

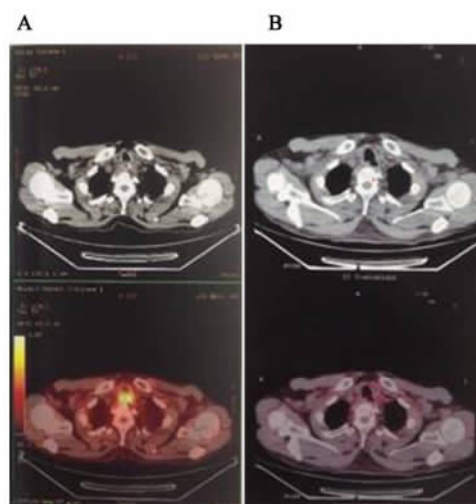


图 1 DC-CIK 治疗后某患者的瘤灶显著缩小 (PET 扫描)

Fig. 1 A case of reduction of tumor foci in patient with esophageal after DC-CIK treatment (PET scan)

A: Before DC-CIK treatment;

B: After DC-CIK treatment

2.2 治疗后外周血淋巴细胞亚群变化

动态监测患者接受 DC-CIK 细胞免疫治疗前后淋巴细胞亚群的变化情况, 与治疗前比较, 20 例食道癌患者的淋巴细胞亚群中, Th1、Th2 细胞比例在

治疗后明显增加 ($P < 0.05$), $CD3^+ CD4^+ CD8^-$ 、 $CD3^+ CD4^- CD8^+$ 、 $CD3^+ CD19^-$ 细胞比例治疗前后无明显变化, 见表 2。

表 2 20 例食道癌患者接受 DC-CIK 治疗后淋巴 T 细胞亚群的变化 (%)

Tab. 2 Change of T-lymphocyte subsets in pre-and post-treatment of DC-CIK in 20 patients with esophageal cancer (%)

Lymphocyte subset	Pre-treatment	Post-treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
$CD3^+ CD4^+ CD8^-$	30.7 ± 10.4	31.5 ± 8.9	0.607	0.555
$CD3^+ CD4^- CD8^+$	34.6 ± 14.2	31.3 ± 10.3	1.601	0.109
$CD3^+ CD19^-$	70.4 ± 12.0	66.7 ± 12.5	1.696	0.09
Th1	3.6 ± 5.9	$14.5 \pm 13.3^*$	-3.358	0.015
Th2	0.6 ± 0.5	$1.0 \pm 0.7^*$	-3.340	0.016

* $P < 0.05$ vs pre-treatment of DC-CIK

2.3 安全性

20 例中晚期食道癌患者治疗前后血常规、肝肾功能无明显变化, 治疗过程中 20 例患者均未出现发热和寒颤等相关不良反应。

3 讨论

食道癌在发病初期具有无症状的特征^[5], 但是到临床症状开始表现的时候, 患者往往已经处于晚期。尽管手术和放射治疗手段多年来不断改进, 但经手术切除治疗的食道癌患者 5 年生存率仅仅为 23.1%^[6], 复发率更是高达 64%^[7]。基于抗原提呈的 DC 疫苗被认为是一种有前途的肿瘤生物治疗手段^[8-9], 目前全球范围内已经有 3 种 DC 肿瘤疫苗获得了上市批准: HybriCell (Genoa Biotenologia, 巴西)、CreaVax RCC (CreaGene, 韩国) 和 Sipuleucel-T (Dendreon, 美国)^[10-11]。CIK 细胞是一种用 PBMC 在体外经过多种细胞因子 (如 IFN- γ 、IL-1、IL-2、CD3 单抗) 培养激活后获得的非 MHC 限制性的、对肿瘤细胞具有杀伤毒性的 NK-like T 细胞, 具有更强的细胞增殖能力和更强的杀伤肿瘤细胞的功能。Sadanga 等^[12]发表了 DC 疫苗在 12 例胃肠道肿瘤患者治疗的临床研究报道, 其中 2 例食道癌患者明显好转, 1 例食道癌块由 3.0 cm \times 2.5 cm 下降到 2.0 cm \times 2.0 cm, 另外 1 例由 6.5 cm \times 4.0 cm 下降到 5.5 cm \times 3.5 cm; 并且, CIK 细胞在抗肿瘤的临床研究中表现出较强的疾病控制率^[13]。

本研究以 ORR 和 DCR 为研究终点, 观察发现, 20 例食道癌患者接受 DC-CIK 细胞免疫治疗后,

ORR 为 35%, DCR 为 65%; 患者未出现明显不良反应。患者接受 DC-CIK 细胞免疫治疗后, Th1、Th2 细胞明显增加 ($P < 0.05$)。Th1 细胞^[14]通过分泌 IFN- α 来调控细胞免疫反应, 从而激活抗原提呈细胞, 而且可通过部分抗体的产生增加抗原提呈细胞对肿瘤细胞的摄取; Th2 细胞主要是通过分泌 IL-4 来调控体液免疫反应, 而且在体液免疫的过程中, Th2 细胞担当着重要角色。由此可见, Th1 细胞在细胞免疫治疗中担当着重要作用, 尤其在细胞免疫治疗的过程中。本研究发现, 经 DC-CIK 治疗后, 部分食道癌患者的 Th1 和 Th2 细胞均增加, 尤以 Th1 细胞增加的水平更为明显。从免疫学的水平上证明了细胞免疫治疗的有效性。

综上所述, 本研究的 20 例食道癌患者接受了 DC-CIK 细胞免疫治疗后, 临床症状得以改善, 并且在一定程度上提高临床疗效的同时, 还能够减缓食道癌的疾病进展。但是本研究为回顾性病例分析, 相对入组的患者较少, 对接受 DC-CIK 细胞治疗的食道癌患者的疗效特别是对远期疗效及其对肿瘤患者生存期的影响仍需进一步用随机对照临床试验加以证实。结合本研究的结果推论, 免疫治疗的临床疗效达不到预期效果, 与以下几个因素有关: 第一, 缺乏一种标准性和个体化的治疗方案; 第二, 到目前为止对于使用 DC 疫苗最佳的使用途径还没有达成一致意见; 第三, 尚没有公认的、明确的适应证的选择标准以及入组标准; 第四, 处于进展期的肿瘤患者, 通过多重免疫调控机制显著抑制了机体的免疫系统, 而且可损伤 DC 细胞的提呈功能。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-70.
- [2] Yang W, Yu J. Immunologic function of dendritic cells in esophageal cancer [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(7): 1739-1746.
- [3] Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy revisited [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(8): 591-600.
- [4] Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes current status and new strategies [J]. Hum Cell, 2003, 16(4): 183-189.
- [5] Gholamin M, Moaven O, Farshchian M, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes primed with tumor RNA-loaded dendritic cells in esophageal squamous cell carcinoma: Preliminary step for DC vaccine design [J/OL]. BMC Cancer, 2010, 10: 261. [2014-05-10]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/261>.
- [6] Brusselaers N, Ljung R, Mattsson F, et al. Education level and survival after oesophageal cancer surgery: A prospective population-based cohort study [J]. BMJ Open, 2013, 3(12): e003754.
- [7] Smit JK, Pultrum BB, van Dullemen HM, et al. Prognostic factors and patterns of recurrence in esophageal cancer assert arguments for extended two-field transthoracic esophagectomy [J]. Am J Surg, 2010, 200(4): 446-453.
- [8] Palucka K, Ueno H, Banchereau J. Recent development in cancer vaccines [J]. J Immunol, 2011, 186(3): 1325-1331.
- [9] Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 6267-6276.
- [10] Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, et al. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8): 2474-2483.
- [11] Copier J, Bodman-Smith M, Dalglish A. Current status and future application of cellular therapies for cancer [J]. Immunotherapy, 2011, 3(4): 507-516.
- [12] Sadanga N, Nagashima H, Mashino K, et al. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(8): 2277-2284.
- [13] Wu C, Jiang J, Shi L, et al. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2008, 28(6B): 3997-4002.
- [14] Disis ML. Immune regulation of cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(29): 4531-4538.

[收稿日期] 2014 - 06 - 12

[修回日期] 2014 - 10 - 15

[本文编辑] 黄静怡

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		