

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.013

自体不成熟树突状细胞胸腔内注射治疗化疗耐药的肿瘤患者恶性胸腔积液

朱学军^{1,2},孔祥图¹,范振芳¹,张文曦¹,陈健一¹,倪海雯¹,孙雪梅¹(1. 江苏省中医院 血液科,江苏 南京 210029; 2. 江苏省中医院 中心实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察体外扩增的不成熟树突状细胞(dendritic cells, DC)胸腔内注射对恶性胸腔积液的疗效和安全性。**方法:**从6例对化疗耐药的恶性胸腔积液患者采集外周血单个核细胞,体外细胞因子诱导培养获得不成熟DC,每周患者胸腔内注射DC(5~10)×10⁷个,连续3次为一疗程,观察治疗后患者胸腔积液的变化及治疗的不良反应,流式细胞仪检测胸水中T细胞、NK细胞亚群。**结果:**总体疗效为:CR 2例,PR 1例,SD 1例,PD 2例,有效率为50%(3/6),获益率(CR+PR+SD)为66.7%。2例CR均为肾癌患者,缓解时间达26周和147周;3例肺癌患者中1例PR、1例SD及1例PD;1例恶性胸膜间皮瘤PD;治疗中无严重不良反应发生。DC治疗后6例患者胸水中的T细胞百分率均较治疗前上升,但差异无统计学意义;NK细胞百分率较治疗前明显上升(P<0.05)。**结论:**采用无抗原加载的自体不成熟DC胸腔内注射治疗恶性胸腔积液的疗效肯定,可能主要是通过NK细胞介导,是一种安全、有效的治疗方法。

[关键词] 胸腔积液;恶性;树突状细胞;免疫治疗

[中图分类号] R737.54; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0354-04

Treatment of chemotherapy resistant malignant pleural effusion with injection of autologous immature dendritic cells

Zhu Xuejun^{1,2}, Kong Xiangtu¹, Fan Zhengfang¹, Zhang Wenxi¹, Chen Jianyi¹, Ni Haiwen¹, Sun Xuemei¹(1. Department of Hematology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. The Central Laboratory of Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect and safety of intrapleural injection of *in vitro* expanded immature dendritic cells (DC) for the treatment of malignant pleural effusion. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were collected from 6 patients with chemo-resistant malignant pleural effusion and cultured with cytokines to expand immature DC *in vitro*. The cells were then intrapleurally injected into the patients (5~10)×10⁷ every 4 weeks for 3 times as a course of treatment. The changes of pleural effusion and side effects in each patient were examined. T cell and NK cell subsets in the pleural effusion were analyzed by flow cytometry. **Results:** Overall, 2 renal cell carcinoma patients had complete responses, 1 lung cancer patients had partial response, 1 lung cancer patients had SD, and 2 other patients had PD. Therefore, the response rate was 50% (3/6) and the benefit rate was 66.7%. Duration of the response of the 2 renal cell carcinoma patients was 26 weeks and 147 weeks respectively. After DC treatment, the percentages of T and NK cells increased in the pleural effusion, but only the increase of NK cells is statistically significant. **Conclusion:** This pilot study indicated that intrapleural injection of none-antigen loaded immature DCs is well-tolerated, has positive effect on the management of malignant pleural effusions, which is likely mediated by NK cells. These results suggest that DC immunotherapy is a promising method to treat malignant pleural effusions in the future.

[Keywords] pleural effusion; malignant; dendritic cells; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(3): 354-361]

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”资助项目(No. 2010-WS-012)。Project supported by the “Six Top Talents Foundation” of Jiangsu Province (No. 2010-WS-012)

[作者简介] 朱学军(1971-),男,江苏省常州人,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤中西医结合治疗

[通信作者] 朱学军(Zhu Xuejun, Corresponding author), E-mail: zhuxj2@sina.com

恶性胸腔积液是恶性肿瘤的常见并发症之一,其生长迅速,常伴有胸闷、气急、心慌等症状,如不及时治疗可造成患者呼吸循环功能障碍,严重者危及生命。目前恶性胸腔积液多采用化疗药物或生物免疫调节剂如沙培林、白介素 2、香菇多糖等胸腔内注射治疗,但较大一部分患者对上述治疗原发耐药,胸腔积液难以消除^[1-2]。树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内功能最强大的抗原提呈细胞,可以激活细胞毒性 T 淋巴细胞及 NK 细胞,诱导抗肿瘤免疫效应。以往的 DC 疫苗策略大多采用体外负载肿瘤抗原的成熟 DC,通过皮下注射或者静脉注射方式回输患者实施免疫治疗。本实验采用体外培养生成的、未予肿瘤抗原负载的患者自体不成熟 DC 胸腔内注射治疗恶性胸腔积液,取得了良好的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2005 年 10 月至 2014 年 10 月经组织学和影像学确诊的 6 例晚期恶性实体肿瘤患者,临床分期均为 IV 期,经病理学和细胞学证实为恶性胸腔积液,并给予一种以上含铂类化疗药物胸腔灌注治疗失败。入组患者中,恶性胸膜间皮瘤 1 例,非小细胞肺癌 3 例,肾癌 2 例;其中男性 3 例,女性 3 例,年龄(62~83)岁,中位年龄 69 岁。肿瘤患者生活质量评分(KPS)≥40 分,预计生存时间>3 个月,治疗前血常规、心电图正常、肝肾功能指标均在≤1.5 倍正常值范围。所有患者和亲属在治疗前均知情同意并签署知情同意书,并经医院伦理委员会论证通过。

1.2 DC 的制备与检测

采用以往建立的方法并做部分改进^[3,4],简言之,应用血细胞分离机(COBE spectra,美国)采集患者外周血,富集单个核细胞液 100 ml,将收取的单个核细胞液经淋巴细胞分离液 400 × g 室温离心 20 min。离心后吸取界面细胞,加入到 30 ml RPMI 1640 培养基中,200 × g 离心 10 min,洗涤 2 遍,收取细胞。将经离心洗涤的单个核细胞用 Cellgro-DC 无血清培养基(德国 Cellgenix 公司)配成 4 × 10⁶ 个/ml 的细胞悬液,种入 750 ml 无菌 Falcon 培养瓶,接种体积 25 ml。将盛有细胞的培养瓶置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养贴壁 2 h。将培养瓶取出,轻轻摇晃十数次,使非贴壁细胞悬起,去除悬浮细胞,再缓慢往瓶中加入 30 ml RPMI 1640 培养基,轻轻晃动洗去残留非贴壁细胞。往保留贴壁细胞的培养瓶中加入 30 ml 含重组人粒细胞-巨噬

细胞生长因子(rhGM-CSF)1 000 U/ml、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)500 U/ml 的无血清 DC 培养基,置 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中继续培养。培养至第 3 天,往培养瓶中补充 30 ml 含 rhGM-CSF 1 000 U/ml、rhIL-4 500 U/ml 的无血清 DC 培养基,继续培养 4 d,即获得 DC。每次换液后及细胞回输前进行细菌、真菌培养检测。细胞回输前用 FITC/PE 标记的 CD1a、CD83、HLA-DR、CD80、CD86、CD14、CD3、CD19 抗体(BD 公司)标记,流式细胞仪(Coulter,FC500)检测 DC 的纯度。

1.3 治疗方案

患者在 B 超定位下确定穿刺点,缓慢引出胸腔积液 500 ml,随后注入 DC 细胞悬液 10 ml,DC 细胞数为(5~10) × 10⁷ 个。输注前给予异丙嗪 25 mg 肌肉注射预防过敏反应,记录每次治疗后 48 h 内有无寒战、发热、过敏和心肺功能变化。体温 <38.5 °C 不予处理,≥38.5 °C 给予塞来昔布 0.2 g 口服退热,1 周内避免使用激素。随后治疗同上,1 次/4 周,3 次为 1 个疗程。

1.4 观察指征及疗效判断标准

患者在治疗前及每次治疗结束后 21 d 做 B 超或胸部 X 线片检查以判断疗效,参考 WHO 癌性积液疗效的判定标准:完全缓解(CR)为积液完全消失且持续 4 周以上;部分缓解(PR)为积液显著减少 ≥50% 且持续 4 周以上;稳定(SD)为积液减少 <50%,无增加趋势,症状部分缓解。治疗前及治疗结束后进行 KPS 评分,同时检测血常规、肝肾功能及电解质。患者在治疗当天和治疗结束后第 7 天,分别抽取胸水行流式细胞术检测胸水中 T 细胞、NK 细胞亚群。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对资料 *t* 检验或单因素方差分析,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者外周血培养 DCs 的形态和表型

6 例患者均成功体外扩增出半成熟 DC,具有典型的树突状形态。流式细胞仪检测(图 1)显示,表达 CD1a 的 DC 的比例为(56.23 ± 6.75)% ~ (87.56 ± 8.20)%,DC 高表达 CD80、CD86 和 HLA-DR,其中 CD83⁺ 细胞 <5%,提示为不成熟 DC;其余为表达 CD14 的单核细胞。锥虫蓝拒染检测细胞活力均 >95%,无细菌、真菌污染。这些指标与国外报道的结果一致。

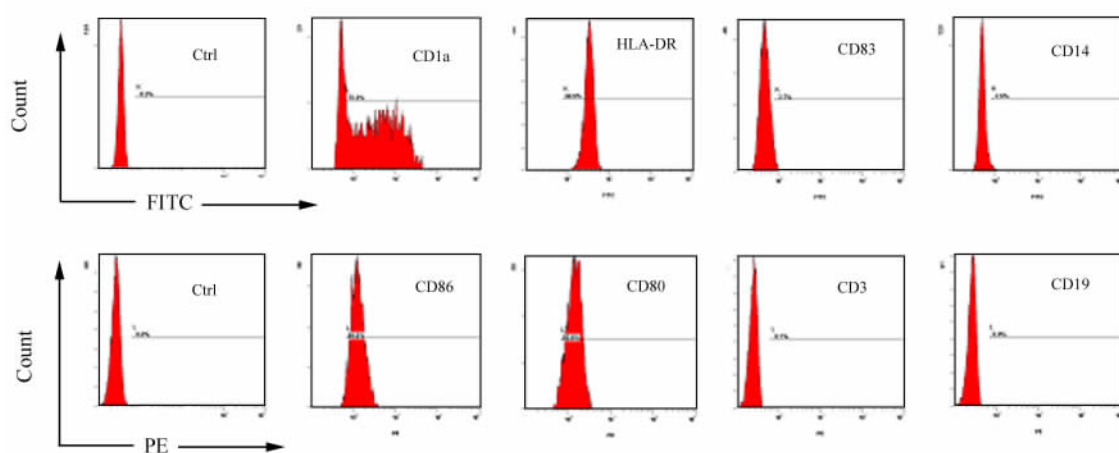


图1 患者外周血培养生成的不成熟 DC 的免疫表型分析
Fig. 1 Immunophenotype analysis of cultured immature DC

2.2 疗效评价

所有患者均完成 1 个疗程的治疗, 治疗结束后 21 d 复查胸腔 B 超, 总体疗效为: CR 2 例, PR 1 例, SD 1 例, PD 2 例, 有效率为 50% (3/6), 获益率 (CR + PR + SD) 为 66.7%。2 例 CR 患者均为肾癌, 且经患侧肾脏切除术后, 其中一例患者伴有肝脏、颅内转移, DC 治疗前患侧胸腔大量血性胸水, 每周需要抽取胸腔积液 2 次才能缓解胸闷、呼吸困难症状, DC 胸腔内注射 1 次后胸水即显著吸收, 胸闷症状缓解, 其后不再需要继续抽取胸腔积液, DC 治疗 3 次后胸腔积液完全消失, 患者的缓解时间达 147 周; 另一例肾癌患者 DC 胸腔内注射 1 次后胸水也显著吸收, 胸闷症状缓解, 21 d 复查胸腔 B 超积液显著减少, 缓解时间达 26 周。1 例 PR、1 例 SD 及 1 例 PD 患者均为肺癌, 3 例患者治疗后的 KPS 评分升高, 1 例稳定, 2 例下降。

2.3 治疗前后胸水中 T、NK 细胞亚群的变化

DC 治疗后, 6 例患者胸水中的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分率均较治疗前上升, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); NK 细胞 (CD16⁺ CD56⁺) 百分率较治疗前明显上升 [(38.36 ± 6.87)% vs (16.85 ± 5.64)% , $P < 0.05$]。

2.4 不良反应

所有患者胸腔输注过程顺利, 无过敏反应发生。其中 3 例患者在第 1 次输注 4 h 后出现低热, 体温最高 38.0 °C, 未用特殊处理 24 h 内均自行降至正常。所有患者均无局部疼痛、胸腔内烧灼感等其他不适, 无严重不良反应发生。治疗前后血常规、肝、

肾功能及电解质均无明显变化。

3 讨论

以 DC 为基础的免疫治疗基于以下原理: DC 能够捕获肿瘤抗原提呈给 T 细胞, 产生肿瘤特异性 T 细胞的免疫应答^[5-6]。目前 DC 疫苗的策略是先体外培养获得 DC, 加载肿瘤抗原后通过皮下注射、静脉注射或淋巴结内注射等途径回输给患者^[7]。由于很大一部分肿瘤患者不能取得有效的肿瘤抗原, 因此不能实施该治疗或者难以获得理想的临床疗效。恶性体腔积液中存在大量的肿瘤细胞, 部分肿瘤细胞由于生长环境的改变发生凋亡或坏死, 这些凋亡的肿瘤细胞和坏死细胞碎片是良好的肿瘤抗原。由于成熟 DC 抗原摄取能力大大降低, 因此本实验通过体外培养获得不成熟 DC, 直接进行胸腔积液内注射, 这些 DC 细胞活性好, 能够识别并提呈肿瘤抗原, 诱导特异性抗肿瘤免疫应答。

大部分国内外临床试验中每次注射 DC 的细胞数为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 个, 本研究每次注射 DC 的数量为 $(5 \sim 10) \times 10^7$ 个, 与多数临床试验中所采用的剂量大。结果表明, 经过 3 次 DC 回输, 治疗恶性胸腔积液的有效率达 50%, 获益率为 66.7%。其中 2 例肾癌患者 DC 胸腔内注射 1 次后胸水即显著吸收, DC 治疗 3 次后胸腔积液完全消失, 患者的缓解时间达 26 周和 147 周, 治疗后的 KPS 评分升高。以往通过肾癌小鼠模型证实了 DC 免疫治疗的有效性, 本研究中临床应用不成熟 DC 胸腔内注射治疗肾癌胸水的疗效满意, 且无严重不良反应发生, 治疗

后患者的生活质量提高,提示有希望发展成为有效的临床治疗方法。

对 DC 治疗前后胸腔积液中 T 细胞、NK 细胞亚群的检测发现,DC 治疗后 6 例患者胸水中的 T 细胞百分率均较治疗前上升,但差异无统计学意义($P > 0.05$);NK 细胞百分率较治疗前明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DC 与 NK 细胞间的信号交谈(crosstalk)在驱动免疫反应中起到重要的作用,DC 疫苗可以增强 NK 细胞的细胞毒活性,刺激 NK 细胞的细胞因子分泌 IFN- γ 、TNF- α ,以及通过 IL-12、IL-15、IL-18、CXCL9 等促进 NK 细胞的迁移;反过来,活化的 NK 细胞能进一步反向作用于 DC 疫苗,促进体内 DC 的成熟^[8]。有趣的是,近年来一些研究者^[9-12]报告了单独应用无抗原加载的 DC(裸 DC)进行体内接种,结果发现产生较强的抗肿瘤效果,能够以 NK 细胞依赖性的方式清除肿瘤;此外在部分 DC 疫苗研究的对照组实验中,也发现无抗原加载的 DC 能够诱导 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫^[10, 13-14]。本研究中采用无抗原加载的 DC 胸腔内注射产生的抗肿瘤效应,也可能主要是通过 NK 细胞介导。

综上所述,不成熟 DC 免疫治疗恶性胸腔积液是一种安全、有效的治疗方法,有望在进一步的临床研究中应用。

[参 考 文 献]

- [1] 施焕中. 规范恶性胸腔积液的诊断与治疗 [J]. 中华内科杂志, 2014, 53(3): 166-167.
- [2] 张磊, 何明. 恶性胸腔积液治疗的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(22): 4145-4148.
- [3] 朱学军, 李晓惠, 夏雯, 等. 人外周血树突状细胞体外稳定、高效培养的新方法 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(6): 575-577.

- [4] 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 等. 人外周血树突状细胞的体外扩增与鉴定 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(4): 302-306.
- [5] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future [J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30:1-22.
- [6] 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.
- [7] Ahmed MS, Bae YS. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2014, 3(2): 113-116.
- [8] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. NK cells: Key to success of DC-based cancer vaccines? [J]. Oncologist, 2012, 17(10): 1256-1270.
- [9] Nagasaki E, Takahara A, Koido S, et al. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK cell-mediated antitumor activity through the tumor necrosis factor- α pathway [J]. J Immunother, 2010, 33(5): 467-474.
- [10] Shimizu K, Fujii S. DC therapy induces long-term NK reactivity to tumors via host DC [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(2): 457-468.
- [11] Shimizu K, Asakura M, Fujii S. Prolonged antitumor NK cell reactivity elicited by CXCL10-expressing dendritic cells licensed by CD40L⁺ CD4⁺ memory T cells [J]. J Immunol, 2011, 186(10): 5927-5937.
- [12] Boudreau JE, Stephenson KB, Wang F, et al. IL-15 and type I interferon are required for activation of tumoricidal NK cells by virus-infected dendritic cells [J]. Cancer Res, 2011, 71(7): 2497-2506.
- [13] Boudreau JE, Bridle BW, Stephenson KB, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus transduction of dendritic cells enhances their ability to prime innate and adaptive antitumor immunity [J]. Mol Ther, 2009, 17(8): 1465-1472.
- [14] Delluc S, Hachem P, Rusakiewicz S, et al. Dramatic efficacy improvement of a DC-based vaccine against AML by CD25 T cell depletion allowing the induction of a long-lasting T cell response [J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(10): 1669-1677.

[收稿日期] 2015-04-15

[修回日期] 2015-05-28

[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 Mean 或 M ; (2)标准差用英文小写 s , 不用 SD; (3)标准误用英文小写 s_x , 不用 SE; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7)相关系数用英文小写 r ; (8)自由度用希腊文小写 ν ; (9)样本数用英文小写 n ; (10)概率用英文大写 P ; (11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)