

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.018

· 临床研究 ·

自体 DC-CIK 细胞联合微波热凝治疗肝癌的疗效观察

寇晓霞, 黄耀, 袁振刚, 吴孟超, 钱其军(200438 上海, 第二军医大学东方肝胆外科医院, 生物治疗科)

[摘要] **目的:** 观察自体 DC-CIK 细胞联合经皮微波热凝(percutaneous microwave coagulation therapy, PMCT)治疗肝癌的临床疗效。**方法:** 收集2012年1月至2014年2月东方肝胆外科医院生物治疗科收治的44例行PMCT+DC-CIK治疗的肝癌患者(联合治疗组),先行血细胞分离单采并进行DC-CIK细胞培养,采血后第2天进行PMCT治疗;培养10d后行CIK细胞回输及DC疫苗皮内注射。此后分别于1、2个月后行第2疗程及第3疗程DC-CIK细胞治疗。同时选取44例单纯行PMCT治疗的同期肝癌患者与之配对(对照组),该组患者仅行PMCT治疗。观察两组治疗前后的AFP变化、免疫功能、无进展生存期、总生存期及不良反应。**结果:** 联合治疗组、对照组治疗后均有AFP下降及外周血调节性T细胞降低,但联合治疗组下降程度更显著($P < 0.05$);对照组治疗后外周血淋巴细胞亚群无明显变化($P > 0.05$),而联合治疗组则显著升高($P < 0.05$)。联合治疗组中位无进展生存时间及中位总生存时间均较对照组延长(7.1 vs 4.9个月;21.5 vs 14.0个月,均 $P < 0.05$)。**结论:** 自体DC-CIK细胞联合PMCT是治疗肝癌的一种有效方法,可提高患者免疫功能、延缓肿瘤复发、延长生存期,且不良反应较少。

[关键词] 树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤(DC-CIK)细胞;微波热凝治疗;肝癌;过继免疫治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54; R730.58 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)04-0509-05

Efficacy of the combined therapy with autologous dendritic cells-cytokine induced killer cells and percutaneous microwave coagulation for hepatocellular carcinoma

Kou Xiaoxia, Huang Yao, Yuan Zhengang, Wu Mengchao, Qian Qijun(Department of Biotherapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the clinical efficacy of combined therapy using autologous dendritic cells-cytokine induced killer cells (DC-CIK) and percutaneous microwave coagulation (PMCT) in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Methods:** Forty four patients with hepatocellular carcinoma treated with PMCT and DC-CIK (combination group) and 44 patients treated with PMCT alone (control group) were enrolled in the Department of Biotherapy of Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital from January 2012 to February 2014. For patients in the combination group, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on day 1 and PMCT were performed on the second day. After a ten day-culture, the DC-CIK cells were generated and transfused back to patients together with intradermal injection of DC vaccine. The second and third course of DC-CIK therapy were given one month and two months later respectively. The AFP level, immune function, progression-free survival, overall survival, and adverse effects were assessed for all the patients. **Results:** Although the level of AFP and regulatory T cells in peripheral blood decreased in the patients of both groups, their decline in the combination group was significantly more than that of the control group ($P < 0.05$). Compared with that of pre-treatment, the lymphocyte number and subpopulations didn't change significantly in the control group ($P > 0.05$), but they did increase markedly in the combination group ($P < 0.05$). The median progression-free survival and median overall survival were both increased in the combination group compared with that of the control group (7.1 m vs 4.9 m, 21.5 m vs 14.0 m, $P < 0.05$). **Conclusion:** Adoptive transfer of autologous DC-CIK in combination with PMCT is an

[基金项目] 国家科技重大专项资助项目(No. 2013ZX09102-060; No. 2013ZX10002-010-007; No. 2012ZX0002-014-005)。Project supported by the National Key Science and Technology Program of China (No. 2013ZX09102-060; No. 2013ZX10002-010-007; No. 2012ZX0002-014-005)

[作者简介] 寇晓霞(1982-),女,陕西吴堡人,医师,硕士生,主要从事肝胆肿瘤综合治疗的研究, E-mail: yanyisunnyco@hotmail.com.

[通信作者] 钱其军(Qian Qijun, corresponding author), E-mail: 13311850698@163.com

effective treatment for patients with hepatocellular carcinoma. It improves the immune function, postpones the recurrence of tumor, and prolongs the overall survival with acceptable toxicities.

[**Key words**] dendritic cells-cytokine induced killer (DC-CIK) cell; percutaneous microwave coagulation therapy (PMCT); hepatocellular carcinoma (HCC); adoptive cellular immunotherapy (ACI)

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 509-513]

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内发病率居第五位,病死率居第三位^[1],而我国每年的新增肝癌患者人数居世界首位。手术切除目前仍是首选方法,但只有不到30%的患者有机会接受手术^[2-3],且即使行根治性手术的患者3年存活率不足50%,5年存活率仅20%~30%^[4]。微创治疗由于其操作相对简单、疗效确切、并发症较少等特点近年来被广泛应用,经皮微波热凝治疗(percutaneous microwave coagulation therapy, PMCT)是其中的一种^[5],可起到等同于手术的治疗效果,但是也存在坏死不彻底及复发转移的问题。近年来DC-CIK细胞免疫治疗受到愈来愈多的关注^[6]。本研究主要通过观察及评估PMCT联合DC-CIK细胞治疗肝癌的临床疗效,重点分析联合治疗对AFP水平、免疫功能、无进展生存期(progression-free survival, PFS)及总生存期(overall survival, OS)的影响,为临床进一步广泛应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象及一般资料

收集2012年1月至2014年2月东方肝胆外科医院生物治疗科收治的44例行PMCT+DC-CIK治疗的肝癌患者(联合治疗组),同时选取44例单纯行PMCT治疗的同期肝癌患者(对照组),两组患者的一般情况及肿瘤大小、个数等病理特征均相似,具可比性(表1)。所有患者均根据临床资料或病理明确诊断,且病历资料完整。入选标准:(1)年龄≥18岁,≤75岁;(2)ECOG评分≤2;(3)单个肿瘤直径≤5 cm,肿瘤个数≤5个;(4)Child-pugh分级为A级、B级;(5)主要实验室指标中血小板≥50×10⁹/L、凝血酶原时间(PT)≤16 s;(6)心功能、肾功能正常。排除标准:(1)Child-pugh分级B级以上,或合并腹水;(2)合并门静脉癌栓;(3)凝血功能障碍;(4)合并感染;(5)合并自身免疫性疾病;(6)器官移植后长期使用免疫抑制剂者或长期使用糖皮质激素者;(7)对白介素-2或生物制剂过敏者。

1.2 主要试剂及仪器

(1)微波设备为南京庆海微波电子研究所生产

表1 两组患者一般资料比较(n)
Tab. 1 Comparison of general data of two groups patients(n)

Characteristic	Combination (N = 44)	PMCT (N = 44)	P
Age($\bar{x} \pm s, t/a$)			0.842
Average	52 ± 10	53 ± 9	
Range	26 ~ 71	45 ~ 70	
Median	50	51	
Gender			0.568
Male	39	38	
Female	5	6	
Diagnosis			
Clinical diagnosis	12	10	0.736
Pathological diagnosis	32	34	0.873
Operation			
Without operation	14	13	0.445
Postoperative recurrence	30	31	0.503
Diameter of tumor(d/cm)			0.862
≤3	25	28	
>3	19	16	
Number of tumor			0.641
1	17	18	
2	7	9	
≥3	20	17	
Hepatitis			
History of HBV	37	40	0.835
HBV-DNA positive	6	9	0.549
Antiviral therapy	16	19	0.802
History of HCV	1	0	0.763
AFP[$\rho_B / (\mu g \cdot L^{-1})$]			0.541
<20	14	15	
20 ~	17	13	
400 ~	13	16	
Child-pugh stage			0.472
A	37	38	
B	7	6	

的 FORSEA 型微波冷循环辐射器,发射频率为 2 450 kHz,最大输出功率 150 W,有 2 支输出电极,连续可调。穿刺部分长 15 cm、直径 0.19 cm,辐射部分长 1.5 cm,为单泄漏孔式,可直接穿刺使用,传输功率 80 W,最大可承受功率 100 W。(2)血细胞分离机为 FRESENIUS COM. TEC (FRESENIUS KABI 公司),采用 Auto MNC 程序,PIYA 耗材。(3)流式细胞仪采用 Cytomics™ FC500(Beckman Coulter 公司)。

1.3 DC-CIK 治疗方案

采集患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用 AIM-V 培养液洗涤两次后稀释至 $4 \times 10^6/L$ 。将细胞转移至培养袋中培养 2 h,收集非贴壁细胞,用于培养 CIK 细胞,贴壁细胞用于制备 DC 细胞。向其中加入含有 GM-CSF、IL-4 和 FLT-3 的培养液,每 2 d 更换 1/2 培养液,补充细胞因子,第 6 天用包含多种肿瘤抗原(TAA)的腺病毒(血清 35 型)进行转染,收集 DC 细胞;培养 24 h 后,向其中加入 TNF- α (100 ng/ml)和 CD40L(50 ng/ml),然后继续培养 2 d。非贴壁细胞收集后调整至 $2 \times 10^9/ml$,然后放入 37 °C、5% CO₂ 孵箱中,加入 IFN- γ (1 000 U/ml)培养,每天更换 1/2 培养液,加入 CD3 多克隆抗体(50 ng/ml)和 IL-2(1 000 U/ml)。第 9 天将经过多抗原刺激的 DC 加入 CIK 培养液中,在上述条件下共同培养 2 d。经细菌、真菌及内毒素检测阴性后分别于第 11、15 天收集悬浮的、经表型鉴定的成熟 DC,溶于 1 ml 生理盐水中,皮内注射于腹股沟淋巴结;分别于第 11、13、15 天收集 CIK 细胞,细胞总数 $> 2 \times 10^{10}/L$,离心、洗涤后,溶于含 0.25% 人血白蛋白的生理盐水溶液(300 ml)中,静脉滴注 30 min 回输入患者体内。

1.4 PMCT 治疗方法

采血后第 2 天进行。术前 30 min 肌肉注射山莨菪碱及盐酸哌替啶,术中全程心电监护、持续吸氧。腹部超声检查后选定体位,在超声引导下选取最佳穿刺点及进针路径,2% 利多卡因局部浸润麻醉,经皮肝穿刺插入微波针至瘤体中心,微波输出功率设置为 80~100 W,具体功率及治疗时间根据肿瘤大小适当调整;采用单次或多次治疗,将超声下可见病灶全部消融,并力求瘤体完全坏死;同时观察肿块超声回声变化,直至完全被高回声覆盖。治疗结束后查看有无针道出血或腹腔出血,随后拔除微波穿刺针,腹带加压包扎。术后常规止血、保肝治疗。

1.5 PMCT 与 DC-CIK 治疗的嵌合

在患者采血后第 2 天进行 PMCT 治疗。CIK 细胞培养 10 d 后分 3 次静脉回输,DC 疫苗分 2 次皮内注射。治疗间隔为每月一次,第 1 疗程 DC-CIK 细胞为采血培养后直接回输,第 2、3 疗程细胞培养为提前 10 d 与患者预约时间,将冻存于 -80 °C 冰箱中的单个核细胞取出,然后进行复苏、培养。所有联合治疗组的患者共接受 3 个疗程 DC-CIK 细胞治疗。

1.6 观察指标及疗效评价

观察指标包括 AFP、免疫功能、PFS、OS 及不良反应。PMCT 术前采用化学发光酶免疫法检测 AFP,术后 1 个月、2 个月分别复查。用流式细胞仪检测患者外周血中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 及调节性 T 细胞的变化。疗效评价根据 2009 年修订版(1.1 版)实体瘤疗效评价标准(mRECIST)进行评价^[7]。PMCT 术后 1 个月复查增强 CT,评估病灶坏死是否彻底及热凝效果,此后每 2 个月复查 1 次,直至肿瘤进展(出现新病灶或转移)。生存时间从第 1 次接受治疗开始计算,随访时间至 2014 年 12 月,联合治疗组的中位随访时间为 13 月(4~37.5 个月),对照组的中位随访时间为 12 个月(4~35 个月)。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验;计数资料的比较采用 χ^2 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 分析,生存时间比较采用 Log-rank 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 联合治疗组患者 AFP 水平下降更明显

PMCT 术后 1 个月复查增强 CT,两组病灶均彻底坏死。两组治疗后 AFP 水平均有所下降,其中联合治疗组下降例数为 35 例,AFP 均值从(377.99 ± 40.60)下降至(102.48 ± 12.05) $\mu\text{g/L}$,下降幅度为 72.89%;单纯 PMCT 治疗组下降例数为 28 例,AFP 均值从(399.32 ± 27.84)下降至(219.27 ± 14.11) $\mu\text{g/L}$,下降幅度为 45.09%。联合治疗组 AFP 下降程度更为显著($P < 0.05$)。

2.2 两组免疫指标变化的比较

单纯 PMCT 治疗组治疗后外周血淋巴细胞亚群无明显变化($P > 0.05$),而联合治疗组治疗后则显著升高(均 $P < 0.05$),另外,联合治疗组的 Treg 细胞在治疗后明显下降($P < 0.05$,表 2)。

表2 两组治疗前后外周血免疫指标变化(%)

Tab. 2 Changes of immune parameters in peripheral blood of the two groups before and after treatment(%)

Group	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Treg
Combination(n = 44)						
Pre-treatment	61.58 ± 14.12	33.53 ± 12.03	31.99 ± 9.51	2.62 ± 2.02	1.11 ± 0.93	7.74 ± 3.09
Post-treatment	73.01 ± 11.12*	39.42 ± 11.21*	37.80 ± 11.14*	7.33 ± 5.93*	1.71 ± 0.86*	4.45 ± 2.33*
Control (n = 44)						
Pre-treatment	62.78 ± 14.31	34.15 ± 11.35	31.82 ± 10.73	2.76 ± 2.12	1.15 ± 0.82	7.35 ± 4.01
Post-treatment	63.06 ± 14.09	35.72 ± 11.83	32.97 ± 11.54	3.20 ± 2.43	1.27 ± 0.75	5.92 ± 3.72

* P < 0.05 vs pre-treatment in combination group

2.3 两组 PFS 的比较

联合治疗组的中位 PFS 为 7.1 个月(95% CI, 6.0 ~ 8.1 个月),而对照组则为 4.9 个月(95% CI, 4.3 ~ 5.4 个月),两组 PFS 差异有统计学意义(P = 0.001,图1)。

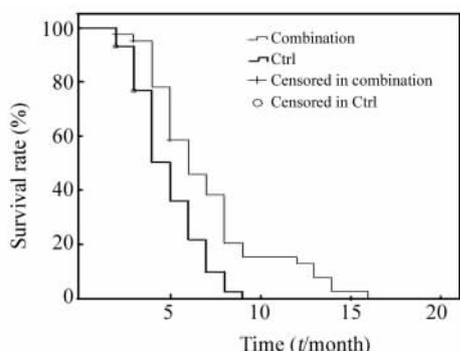


图1 联合治疗组与对照组 PFS 比较
Fig.1 Comparison of PFS between the combination group and control group

2.4 两组 OS 的比较

至随访结束,联合治疗组 23 例患者死亡,而对照组则有 30 例患者死亡。联合治疗组的中位 OS 为 21.5 个月(95% CI,17.2 ~ 25.9 个月),而对照组则为 14.0 个月(95% CI,12.1 ~ 16.0 个月)。两组 OS 差异有统计学意义(P = 0.012,图2)。

2.5 不良反应

不良反应一般在回输后 1 ~ 2 h 出现,主要以发热为主,其中低热(≤38.0 °C)17 例,未经任何处理体温自行恢复正常;中度热(38.0 ~ 39.0 °C)13 例,其中 6 例未进行特殊处理体温自行恢复,另外 7 例使用解热镇痛药后体温降至正常;高热(≥39.0 °C)2 例,持续时间在 2 ~ 8 h,行血常规、C 反应蛋白等检测无明显异常改变,使用解热镇痛药后体温降至正常;另外 12 例患者无任何不良反应。

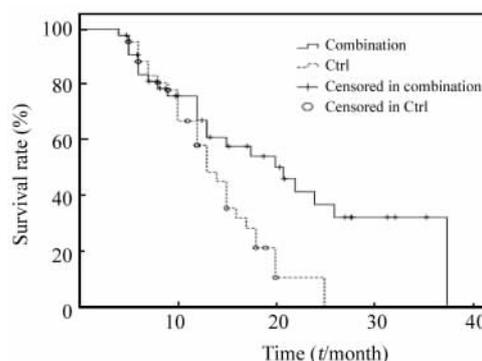


图2 联合治疗组与对照组 OS 比较
Fig.2 Comparison of OS curves between the combination group and control group

3 讨论

肝癌的发病率仍逐年升高,即使根治性切除后每年的复发率也可高达 25%^[8]。PMCT 等微创治疗同样存在复发和转移的问题,需要一种新的方法来巩固手术或微创治疗的效果,延缓肿瘤复发,从而延长患者生存期。免疫逃逸和免疫抑制是导致肝癌复发和转移的重要因素之一^[9]。近年来肿瘤生物治疗成为与手术、放疗及化疗并列的肿瘤第四大治疗模式。

Feng 等^[10]进行了肝癌术后辅助性 CIK 细胞及 LAK 细胞治疗的荟萃分析,结果表明,术后行辅助性细胞免疫治疗可明显降低 1 年复发率(OR = 0.35;95% CI,0.17 ~ 0.71;P = 0.003)及 3 年复发率(OR = 0.31;95% CI,0.16 ~ 0.61;P = 0.001)。Li 等^[11]同样进行了非手术治疗联合 CIK 细胞治疗的荟萃分析,结果也表明,CIK + TACE + RFA 联合治疗组 1 年无复发率明显高于 TACE + RFA 组(OR = 2.46),1 年及 2 年存活率也明显高于对照组(OR:1-year = 2.09;2-year = 2.16)。还有学者^[11]对所有含 CIK 细胞治疗及不含 CIK 细胞治疗的研究

进行了荟萃分析,结果表明,含有 CIK 细胞的治疗组与无 CIK 治疗组相比,1 年、2 年存活率及 PFS 均明显延长,且 AFP 下降程度也更加明显($P < 0.01$)。

本研究中,两组治疗后 AFP 均有降低,但联合治疗组降低更加显著。Treg 在肿瘤免疫中起负调节作用,与肿瘤的生长和转移密切相关,通过降低机体内 Treg 可改善肿瘤预后^[12-14]。本研究中单纯 PMCT 组治疗后外周血 Treg 也较治疗前下降,但联合 DC-CIK 组下降程度更明显。研究^[15]表明,微波治疗产生的高温可导致肝癌组织凝固性坏死,降低肿瘤负荷,使得外周血 Treg 降低,打破机体的免疫抑制,但是有一定的局限性,且效应持续的时间较短。在联合治疗组,通过微波治疗后,肿瘤抗原表位充分暴露,同时促进肿瘤组织合成热激蛋白 HSP70。肿瘤细胞变性坏死后释放抗原多肽,与 HSP70 形成多肽复合物,激活 CD8⁺T 细胞,引起 T 细胞介导的特异性肿瘤免疫应答,此时正是 DC-CIK 细胞发挥作用的最佳时机,通过过继细胞免疫治疗可有效地激活抗肿瘤免疫反应。已有学者^[16-20]报道了针对 HSP70 表达的基因治疗联合 CIK 细胞免疫重建可发挥协同抗肿瘤作用的活性。本研究中,单纯治疗组治疗前后外周血 T 细胞亚群数无明显变化,而联合治疗组中效应 T 细胞的比例均明显升高,这就说明,DC-CIK 对肝癌患者的免疫功能有明显提升作用。本研究还发现,联合 DC-CIK 治疗组的中位 PFS 及 OS 均较单纯治疗组明显延长。DC-CIK 细胞治疗的不良反应主要为发热,且症状轻微,大多数为低热,可自行缓解,无需临床进一步处理,说明 DC-CIK 细胞治疗安全可靠。但本研究为病例-对照研究,具有一定局限性,仍需大样本的前瞻性随机对照试验来验证。

【参考文献】

- [1] Li XF, Dai D, Song XY, et al. A meta-analysis of cytokine-induced killer cells therapy in combination with minimally invasive treatment for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(5): 538-591.
- [2] Huang ZM, Li W, Li S, et al. Cytokine-induced killer cells in combination with transcatheter arterial chemoembolization and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Immunother*, 2013, 36(5): 287-293.
- [3] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907-1917.
- [4] Poon RTP, Fan ST, Ng IOL, et al. Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma critical reappraisal [J]. *Ann Surg*, 2000, 231(4): 544-551.
- [5] 胡清雯, 钱国军. 经皮肝穿刺微波治疗肝癌的严重并发症 18 例分析 [J]. *介入放射学杂志*, 2014, 23(1): 38-41.
- [6] 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.
- [7] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) [J]. *Eur J Can*, 2009, 45(2): 228-247.
- [8] Yu XZ, Zhao H, Liu L, et al. A randomized phase II study of autologous cytokine-induced killer cells in treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Immunol*, 2014, 34(2): 194-203.
- [9] Cui JW, Wang NY, Zhao HJ, et al. Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-free survival for patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(2): 342-351.
- [10] Xie F, Zhang XJ, Li H, et al. Adoptive immunotherapy in postoperative hepatocellular carcinoma: A systemic review [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e42879.
- [11] Ma Y, Xu YC, Tang L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: efficacy and safety [J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 11.
- [12] Chen X, Du Y, Huang ZM. CD4⁺CD25⁺ Treg derived from hepatocellular carcinoma mice inhibits tumor immunity [J]. *Immunol Lett*, 2012, 148(1): 83-89.
- [13] Cabrera R, Ararat M, Xu YL, et al. Immune modulation of effector CD4⁺ and regulatory T cell function by sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(4): 737-746.
- [14] Lin GH, Wang J, Lao XM, et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells [J]. *J Immunother*, 2012, 35(4): 337-343.
- [15] Zhou P, Liang P, Dong BW, et al. Phase I clinical study of combination therapy with microwave ablation and cellular immunotherapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(5): 450-456.
- [16] Hu HZ, Qiu YH, Guo MG, et al. Targeted Hsp70 expression combined with CIK-activated immune reconstruction synergistically exerts antitumor efficacy in patient-derived hepatocellular carcinoma xenograft mouse models [J]. *Oncotarget*, 2014, 6(2): 1079-1089.
- [17] Murphy ME. The Hsp70 family and cancer. *Carcinogenesis* [J]. 2013, 34(6): 1181-1188.
- [18] Wang W, Ji W, Hu H, et al. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with Hsp70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(1): 150-160.
- [19] Xu C, Sun Y, Wang Y, et al. CEA promoter-regulated oncolytic adenovirus-mediated Hsp70 expression in immune gene therapy for pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012, 319(2): 154-163.
- [20] Fagnoni FF, Zerbin A, Pelosi G, et al. Combination of radiofrequency ablation and immunotherapy [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 369-381.

【收稿日期】 2015-01-30

【修回日期】 2015-05-10

【本文编辑】 黄静怡