

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.019

DC 疫苗联合 CIK 细胞免疫治疗 B 细胞淋巴瘤的初步临床观察

Clinical observation of immunotherapy for B cell lymphoma with dendritic cells vaccine combined with cytokine-induced kill cells

朱学军^{1,2}, 姜鹏君¹, 孔祥图¹, 张文曦¹, 夏雯¹, 范振芳¹, 于菊华¹, 孙雪梅¹, 李晓惠¹ (1. 南京中医药大学附属江苏省中医院 血液科, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学附属江苏省中医院 中心实验室, 江苏 南京 210029)

近年来非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)的发病率不断上升,化疗联合美罗华免疫治疗使 NHL 获得了较高的缓解率,但仍有部分患者因为原发耐药或者缓解后复发而无法获得治愈,因此研发新的淋巴瘤治疗方法对于提高疗效,延长患者生存具有重要的意义。近年来树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗免疫治疗各类肿瘤的基础与临床研究受到广泛的关注,通过给患者免疫接种携带肿瘤抗原的 DC,可以诱导患者机体产生特异性的、持久的抗肿瘤免疫应答^[1,2];细胞因子诱导杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞输注可以调节和增强患者机体免疫功能^[3]。因此本研究选择在淋巴瘤化疗完全缓解期,采用淋巴瘤抗原体外冲击的自体 DC 皮下免疫接种患者,其后静脉回输自体 CIK 细胞的方法免疫治疗 B 细胞淋巴瘤,进行了初步的临床观察,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选取 2005 年 6 月至 2014 年 6 月在南京中医药大学附属江苏省中医院血液科进行治疗的 B 细胞淋巴瘤患者共 17 例,其中男性 11 例,女性 6 例,年龄 30 ~ 84 岁,中位年龄 62 岁。纳入标准:(1)所有患者均经病理活检及免疫组织化学染色证实为 B 细胞淋巴瘤;(2)均以 CHOP、CHOPE 或 R-CHOP 方案进行化疗,12 例完成 6 个疗程的化疗,3 例接受了 8 个疗程化疗,2 例仅接受了 4 个疗程的化疗不能耐受或拒绝进一步化疗;(3)年龄 18 ~ 85 岁;(4)Karnofsky 指数 $\geq 80\%$, 预计生存期 > 3 个月;(5)ANC $\geq 2.0 \times 10^9/L$, PLT $\geq 20 \times 10^9/L$, HB ≥ 90 g/L;(6)入组前至少半月内未接受抗肿瘤治疗。排除标准:(1)妊娠或哺乳期妇女;(2)曾接受过器官移植的患者;(3)有活动性感染或其他严重潜在性疾患;(4)伴有其他恶性肿瘤或自身免疫性疾病

者;(5)已被控制的充血性心力衰竭或心绞痛,不能控制的高血压或心律失常,心肌梗塞病史;(6)属过敏体质者;(7)同时合并其它试验性药物或正在参加临床试验者。患者及亲属在治疗前均知情告知,签署知情同意书,并且经医院伦理委员会论证通过。

1.2 主要试剂

人粒细胞-巨噬细胞生长因子(rhGM-CSF)购自厦门特宝公司、重组人白细胞介素-4(rhIL-4)购自上海飞捷生物公司,OK432 购自山东鲁抗制药公司,IFN- γ 购自上海克隆生物公司,人白细胞介素 2(hIL-2)购自江苏金丝利药业公司,OKT3 单抗购自 TaKaRa 公司,RPMI-1640 培养基购自 Biowest 公司,Cellgro-DC 无血清培养基购自德国 Cellgenix 公司,X-VIVO 15 无血清培养基购自美国 Lonza 公司。FITC/PE 标记的 CD1a、CD83、HLA-DR、CD40、CD80、CD86、CD208、CD209、CD3、CD19、CD14、CD4、CD8、CD56、CD16 抗体均购自 BD 公司。

1.3 淋巴瘤裂解抗原制备

切取 1 g 患者 B 细胞淋巴瘤组织,浸入 75% 乙醇浸泡 15 min 灭菌,取出以 NS 洗 3 次后放在 200 目钢网上,加入 5 ml NS 研磨制备成悬液,装入 5 ml 无菌冻存管,放入液氮中冷冻 15 min,再复温至 37 $^{\circ}\text{C}$,如此反复 3 次以后,将肿瘤细胞裂解物加入 15 ml 无菌离心管,3 000 $\times g$ 离心 10 min,收取上清,肿瘤细胞冻融上清经 0.2 μm 的一次性无菌滤器过滤除菌,即为淋巴瘤裂解抗原,1 ml/支分装,放入

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目资助(No. 2010-WS-012);江苏省“卫生拔尖人才”项目资助(No. 2014-333-063)。Project supported by the Six Top Talents Foundation of Jiangsu Province(No. 2010-WS-012), and the Medical Talents Foundation of Jiangsu Province(No. 2014-333-063)

[作者简介] 朱学军(1971-),男,江苏省常州市人,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤中西医结合治疗的研究,E-mail:zhuxj2@sina.com

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

-80℃冰箱保存。

1.4 淋巴瘤抗原冲击的DC的制备与检测

采用本课题组以往建立的方法并做部分改进^[45],简言之,患者在化疗全部结束后30d,应用血细胞分离机(COBE spectra)采集患者外周血,富集单个核细胞液100ml,加入淋巴细胞分离液离心后吸取界面细胞,将单个核细胞用Cellgro-DC无血清培养基配成 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液,培养贴壁2h后收集悬浮细胞用于CIK培养。保留贴壁细胞的培养瓶中加入含rhGM-CSF 1000U/ml、rhIL-4 500U/ml的Cellgro-DC无血清培养基,培养第3天补充无血清培养基继续培养,至第6天,每50ml培养基中加入1ml制备好的患者肿瘤细胞裂解抗原,加入OK432至5mg/L,共培养24h,促进DC成熟,离心收集获得全肿瘤抗原负载的DC。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、CD40、CD80、CD86、CD208、CD209、CD3、CD19、CD56、CD14抗体标记后流式细胞术(Coulter,FC500)检测DC的纯度。

1.5 CIK细胞的制备与检测

上述DC培养过程中贴壁2h后收集获得的悬浮细胞用于CIK细胞培养。将细胞加入X-VIVO 15无血清培养液中,含IFN γ 1000IU/ml,置5%CO₂、37℃,饱和湿度的培养箱中培养,培养第2天加入IL-2 1000IU/ml、OKT3单抗50 μ g/L,以后每3~4d用培养液调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,并加入IL-2 1000IU/ml,培养第10天收集细胞悬液离心去上清后,再用含白蛋白10g/L(上海莱士血制品公司)、IL-2 1000IU/ml的生理盐水洗涤3次,最后将细胞悬于250ml含白蛋白10g/L及IL-2 100IU/ml的生理盐水中。细胞回输前,进行细菌、真菌培养检测,荧光标记的CD3、CD4、CD8、CD56抗体标记后流式细胞仪检测CIK的纯度。

1.6 DC联合CIK细胞免疫治疗B细胞淋巴瘤

患者DC回输采用皮内接种方式,单次注射量为1ml,DC细胞数为 $(5 \sim 10) \times 10^7$,采用1ml注射器行多点皮内注射或皮下注射,每位点0.1~0.2ml,注射部位选择臂三角肌外侧皮肤,避开疤痕组织及破溃部位,输注前给予异丙嗪25mg肌注预防过敏反应,回输后持续监测患者呼吸、心率、血压及体温。3d后进行CIK细胞回输,通过输血器经静脉回输给患者,CIK细胞量为 $(5 \sim 10) \times 10^9$,输注前给予异丙嗪25mg肌注预防过敏反应,记录每次治疗后72h内有无寒战、发热、过敏和心肺功能变化,体温 $<38.5^\circ\text{C}$ 不予处理, $\geq 38.5^\circ\text{C}$ 给予西乐葆0.2

g口服退热,一周内避免使用激素。随后治疗同上,1次/4周,3次为1个疗程。

观察指标:输注过程中及输注后72h内严密观察患者的生命体征,观察有无畏寒、发热、皮疹、胸闷、恶心呕吐等不良反应;治疗相关毒性反应分级参照世界卫生组织规定的急性及亚急性毒性反应标准;疗效判断标准:疗效评估采用WHO疗效标准:完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD)。治疗前后分别检测患者外周血T细胞亚群、NK细胞亚群及外周血免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)浓度,疗程结束后对患者生存状况及肿瘤情况随访6个月。

1.7 统计学处理

采用SPSS16.0统计学分析软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备患者外周血DC及CIK细胞

17例患者均成功在体外扩增出DC,具有典型的树突状形态。流式细胞仪检测显示,表达CD1a⁺的DC的比例为 $(66.35 \pm 14.47)\%$,CD83⁺的DC的比例为 $(31.86 \pm 9.32)\%$,高表达CD80、CD86、CD40、CD208、CD209、HLA-DR(图1),表明经体外培养获得了高纯度的成熟DC。经质控检测台盼蓝拒染检测细胞活力均 $>95\%$,无细菌、真菌污染。培养的CIK细胞检测CD3⁺淋巴细胞 $\geq 85\%$,CD8⁺淋巴细胞 $\geq 60\%$,活细胞比例 $>95\%$,CD3⁺CD56⁺细胞比例为 $(32.91 \pm 13.54)\%$ 。

2.2 DC-CIK细胞治疗后患者的临床症状及生存状况有所改善

17例患者中,8例完成1个疗程的DC-CIK细胞治疗,其余9例完成2个疗程的治疗。所有患者治疗过程中均无严重不良反应发生,4例患者出现接种局部皮肤的过敏性红斑,未做特殊处理,患者自行恢复;其中7例患者在第1次DC和CIK细胞输注后发生低热,最高体温均未超过 38.0°C ,未予特殊临床处理,48h内患者体温自行降至正常范围;5例患者出现恶心、乏力、头晕等反应,但患者均能耐受上述不良反应,肝肾功能及心肌酶谱检测均未见异常。治疗后,11例(64.71%)患者的食欲有所增加、体力有所恢复。1例患者4个月后出现肿瘤复发,其余患者的肿瘤标志物均处于正常范围内,随访期间未发生死亡病例。

2.3 DC-CIK细胞治疗后患者外周血免疫球蛋白含

量有所提高

DC-CIK 细胞治疗后,患者外周血免疫球蛋白 IgA [(2. 61 ± 0. 61) vs (2. 66 ± 0. 63)]、IgG [(8. 43 ± 1. 20) vs (8. 46 ± 1. 18)]和 IgM [(1. 19 ±

0. 29) vs (1. 20 ± 0. 30)]浓度较治疗前有所提高,但差异无统计学意义(IgA: $t = - 1. 442$, IgG: $t = -0. 380$, IgM: $t = -0. 731$,均 $P > 0. 05$)。

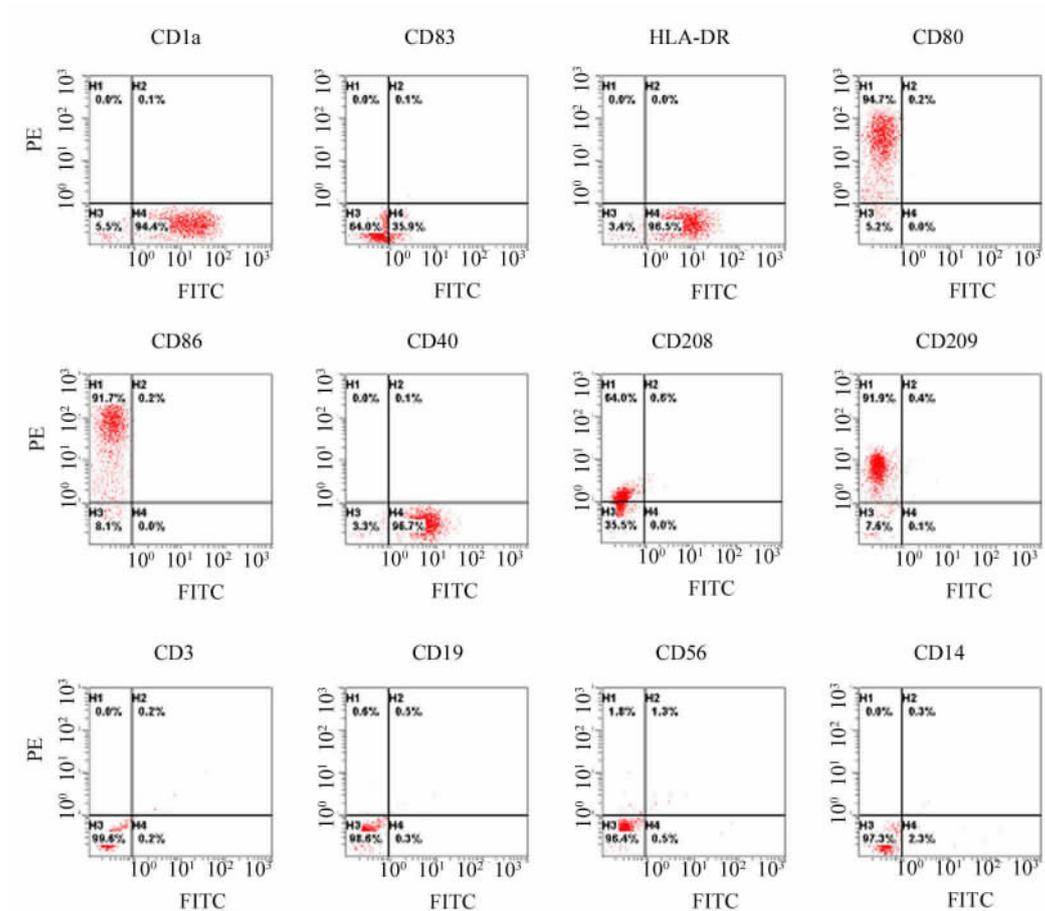


图 1 淋巴瘤患者外周血单核细胞来源 DC 的免疫表型分析

2.4 DC-CIK 细胞治疗后患者外周血 CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ 细胞及 NK 细胞百分率明显增加

DC-CIK 细胞治疗后患者外周血 CD3⁺ 细胞及 CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ 细胞百分率较治疗前无明显变化 (CD3: $t = - 2. 077$, CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻: $t = 0. 335$, $P > 0. 05$), 治疗后外周血 CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ 细胞及 CD3⁻ CD16⁺ 56⁺ 细胞百分率均较治疗前明显增加 (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺: $t = - 5. 032$, CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺: $t = 3. 546$, $P < 0. 05$) (表 1)。

3 讨论

我国淋巴瘤主要为 NHL, 其中大多数为 B 细胞淋巴瘤。最常见的淋巴瘤为小淋巴细胞淋巴瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤等。以淋巴瘤抗原体外冲击的患者自体 DC 治疗 B 细胞淋巴瘤在最初

的报道中取得了令人振奋的临床疗效, 在其后的一系列临床试验中不断获得完善^[6-9]。早期研究中都选用 Id 抗原作为肿瘤抗原, 虽然安全性较好, 但 Id 抗原是免疫原性较弱的抗原, 患者对 Id 抗原的免疫应答不强^[10-12]。淋巴瘤组织裂解产物含有全部的肿瘤抗原, 淋巴瘤组织裂解产物制备方法简单, 易于实施, 且来源于患者自身肿瘤组织, 安全性较好, 淋巴瘤组织裂解产物作为肿瘤抗原冲击的 DC 疫苗具有一定的优势^[13-14]。

对于 DC 疫苗在临床免疫治疗中纯度的要求, 目前国外已批准的临床方案中, 多数报道的终产品 DC 纯度在 50% ~ 90%^[15]。贴壁法富集单核细胞培养的 DC 中会残存少量淋巴细胞及单核细胞, 不会对机体造成损伤。本研究制备的 DC 纯度达到临床治疗的要求。

DC疫苗制剂单次回输的数量,国内外临床试验中的使用范围从 $10^5 \sim 10^8$ 不等,通常采用 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$,本研究单次回输的DC数量采用 $(5 \sim 10) \times 10^7$,这样可以避免因回输的数量太少而降低疗效,也可以降低因为数量太大而引发自身免疫性疾病的风险。本研究使用的DC剂量比大部分国内外临床试验的细胞数要高,此外3 d后合并静脉回输CIK细胞,通过CIK细胞分泌大量细胞因子等途径进一步激活体内免疫功能,以协同增强DC疫苗的抗肿瘤疗效。

表1 DC-CIK细胞免疫治疗前后外周血T细胞、NK细胞亚型的变化($\bar{x} \pm s$, $n=17$, %)

亚型	治疗前	治疗后
CD3 ⁺	64.59 ± 12.11	70.71 ± 10.39*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	28.76 ± 11.43	28.15 ± 11.03*
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	20.75 ± 6.08	36.61 ± 9.38**
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	14.00 ± 9.47	21.8 ± 8.33**

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs 治疗前

治疗期间所有患者均没有发生严重的不良反应。少数患者局部皮肤反应、低热、恶心、乏力、头晕等反应,患者均能耐受。64.7%的患者食欲有所增加、体力有所恢复,1例患者出现肿瘤复发,其余患者的肿瘤标志物均处于正常范围内,所有患者随访期间均未发生死亡。对T细胞、NK细胞亚群的检测发现,DC-CIK细胞治疗后患者外周血CD3⁺CD4⁻CD8⁺细胞及NK细胞百分率较治疗前明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,自体DC疫苗联合CIK细胞免疫治疗B细胞淋巴瘤是一种较为安全、副作用极小的免疫治疗方法,能够提高患者机体的免疫功能,特别是在淋巴瘤化疗缓解期,可以提高病人生活质量,有望延长患者无病生存期,需要在临床研究中进一步加以验证。

[关键词] 淋巴瘤;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;免疫治疗

[中图分类号] R733.4; R730.51 [文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0790-04

[参考文献]

[1] Ahmed MS, Bae YS. Dendritic cell-based therapeutic cancer vac-

cines: past, present and future [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2014, 3(2): 113-116.

- [2] 朱学军. 树突状细胞疫苗治疗恶性肿瘤:挑战与希望[J]. 内科理论与实践, 2008, 3(2): 33-36.
- [3] 贾祝霞,卢绪章,岑岭岭,等. 化疗联合CIK细胞治疗对非霍奇金淋巴瘤患者细胞因子的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012, 32(6): 859-862.
- [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] 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.
- [6] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [J]. Nat Med, 1996, 2(1): 52-58.
- [7] Leitch HA, Connors JM. Vaccine therapy for non-Hodgkin's lymphoma and other B-cell malignancies [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2005, 6(6): 597-604.
- [8] 刘丽,范振芳,朱学军. 恶性淋巴瘤的树突状细胞疫苗治疗进展[J]. 淋巴瘤·白血病, 2009, 18(8): 502-505.
- [9] Brody J, Kohrt H, Marabelle A, et al. Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(14): 1864-875.
- [10] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients [J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.
- [11] Redfern CH, Guthrie TH, Bessudo A, et al. Phase II trial of idiotype vaccination in previously treated patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma resulting in durable clinical responses [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(19): 3107-3112.
- [12] Inoges S, Rodriguez-Calvillo M, Zabalegui N, et al. Clinical benefit associated with idiotype vaccination in patients with follicular lymphoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(18): 1292-1301.
- [13] Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(20): 2787-2794.
- [14] Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, et al. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study [J]. Blood, 2009, 113(1): 18-27.
- [15] Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future [J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 1-22.

[收稿日期] 2015-11-06

[修回日期] 2015-11-30

[本文编辑] 黄静怡