

胃癌术后化疗联合自体肿瘤细胞抗原致敏 DC-CIK 细胞治疗的疗效

张子龙, 曾放, 庞典付, 张克难(湖北省荆州市中心医院 胃肠外科, 湖北 荆州 434020)

[摘要] **目的:**探讨进展期胃癌根治术后化疗联合自体肿瘤细胞抗原致敏树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤(autologous tumor antigen load dendritic cells-cytokine-induced killer, Ag-DC-CIK)细胞治疗的疗效和安全性。**方法:**收集2013年1月至2014年3月于荆州市中心医院胃肠外科诊断为进展期(Ⅱ期和Ⅲ期)胃癌的60例患者,均接受胃癌D2根治术,术后按照随机数字表法分为两组,单纯化疗组采用FOLFOX化疗方案,给予6个周期化疗;联合治疗组除给予上述化疗外,同时给予Ag-DC-CIK细胞进行治疗。随访期2年,观察两组患者2年OS和PFS、外周血T细胞亚群免疫学指标($CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD3^+CD56^+$)、生活质量评分、化疗不良反应分级。**结果:**联合治疗组患者2年OS及PFS较单纯化疗组明显提高(均 $P < 0.05$)。联合治疗组治疗前后外周血T细胞亚群水平无明显变化($P > 0.05$),而单纯化疗组治疗后外周血T细胞亚群水平明显降低($P < 0.05$),且明显低于联合治疗组($P < 0.05$);联合治疗组的综合生活质量评分明显高于单纯化疗组[(7.25 ± 1.56) vs (5.54 ± 1.27)分, $P < 0.05$]。联合治疗组不良反应发生率明显低于单纯化疗组(10.0% vs 20.0%, $P < 0.05$)。**结论:**Ag-DC-CIK细胞治疗联合化疗能显著提高胃癌术后患者的2年OS及PFS,保护机体的免疫功能,减少化疗的不良反应,改善其生活质量。

[关键词] 胃癌;化疗;自体肿瘤细胞抗原;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;自体肿瘤细胞抗原致敏树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞

[中图分类号] R735.2; R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)06-0660-05

Efficacy of chemotherapy combined with autologous tumor antigen load dendritic cells-cytokine induced killer cell therapy in the treatment of gastric cancer patients after surgery

ZHANG Zilong, ZENG Fang, PANG Dianfu, ZHANG Kenan(Department of Gastrointestinal Surgery, Central Hospital of Jingzhou City, Jingzhou 434020, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the clinical efficacy and safety of chemotherapy combined with autologous tumor antigen load dendritic cells-cytokine-induced killer (Ag-DC-CIK) cell therapy in the treatment of gastric cancer patients after D2 surgery. **Methods:** The present study enrolled 60 patients with gastric cancer in progressive stage (stage II, stage III) who underwent D2 surgery in the department of gastrointestinal surgery, Jingzhou Central Hospital during January, 2013 to March, 2014. The patients were randomly divided into chemotherapy group (FOLFOX regimen for 6 cycles) and combined treatment group (FOLFOX chemotherapy for 6 cycles + Ag-DC-CIK cell therapy). The patients were followed up for two years. The two-year overall survival (OS) and progression free survival (PFS), the levels of T cell subsets in the peripheral blood ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+CD56^+$), quality of life and adverse reactions were evaluated in the two groups. **Results:** Compared to the chemotherapy group, the two-year OS and PFS were significantly higher in combined treatment group (both $P < 0.05$). There was no significant difference in level of T cell subsets in peripheral blood of patients between pre-treatment and post-treatment in combined treatment group ($P > 0.05$); however, the level of T cell subsets in the peripheral blood of patients of chemotherapy group decreased significantly ($P < 0.05$), and it was significant lower than that of combined treatment group ($P < 0.05$). Compared to the chemotherapy group, the combined treat-

[基金项目] 荆州市科技发展计划资助项目(No. 2014048)。Project supported by the Science and Technology Support Project of Jingzhou City (No. 2014048)

[作者简介] 张子龙(1981-),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的基础及临床研究,E-mail: zzl062481@126.com

[通信作者] 张克难(ZHANG Kenan, corresponding author),硕士,主任医师,主要从事胃肠肿瘤的基础及临床研究,E-mail: 459154033@qq.com

ment group had higher quality of life ($[7.25 \pm 1.56]$ vs $[5.54 \pm 1.27]$, $P < 0.05$) and lower adverse reactions (10.0% vs 20.0% , $P < 0.05$). **Conclusion:** Ag-DC-CIK cell therapy in combination with chemotherapy, compared with chemotherapy alone, can obviously increase the two-year OS and PFS, protect the immune function of patients, reduce the adverse reactions and improve quality of life for gastric cancer patients.

[**Key words**] gastric cancer; chemotherapy; autologous tumor antigen; dendritic cells; cytokine-induced kill cells; autologous tumor antigen load dendritic cells-cytokin-induced killer (Ag-DC-CIK) cell

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(6): 670-664. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.015]

胃癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其发病率居恶性肿瘤的第4位,中晚期胃癌的5年生存率不足20%^[1]。传统的治疗方法包括手术、化疗、放疗以及最近兴起的分子靶向药物治疗,由于上述几种方法难以完全消除肿瘤组织,包括可能存在的微小病灶以及可能远处转移的肿瘤细胞,而这些因素是导致肿瘤的复发和转移的重要原因,因此上述4种治疗方法在治疗进展期胃癌中效果不甚理想。近年来,细胞免疫治疗飞速发展,其与传统治疗相比,不仅能在不损伤机体正常免疫功能和结构的前提下杀伤肿瘤细胞,起到精确的靶向作用,而且能够增强机体的免疫能力,较传统的抗癌药物有明显的优势^[2],弥补了传统治疗的不足。免疫异常是导致肿瘤复发和转移的最重要因素之一^[3],因此,如何重建正常的免疫环境是抗肿瘤的重要研究课题,目前研究较为热门的是自体肿瘤致敏的DC-CIK细胞。因此,本研究选取了60例进展期胃癌患者为研究对象,探讨自体肿瘤细胞抗原致敏树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤(autologous tumor antigen load dendritic cells-cytokin-induced killer, Ag-DC-CIK)细胞联合化疗治疗胃癌D2根治术术后患者的疗效和安全性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选取2013年1月至2014年3月荆州市中心医院胃肠外科诊断为进展期(Ⅱ期和Ⅲ期)胃癌患者60例,其中男性32例、女性28例,年龄34~76岁,中位年龄54岁。病理诊断均为腺癌,其中高分化腺癌19例,中低分化腺癌41例。将此60例患者按照随机数字表法分为联合治疗组和单纯化疗组,每组30例,两组患者在性别、年龄、临床分期等方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性(表1)。本研究所有患者及家属均签署知情同意书,且经荆州市中心医院伦理委员会审核通过。纳入标准:均在我科行D2胃癌根治术,性别不限;病理诊断为需要行化疗的胃腺癌患者;预计生存期 ≥ 3 个月(参见

胃癌诊疗规范,2011年),ECOG评分0~1分。排除标准:血红蛋白 < 80 g/L,白细胞 $< 3 \times 10^9$ /L,血小板 $< 75 \times 10^9$ /L,ALT、AST、BUN、Cr \geq 正常值上限3.0倍者;对本治疗中所用生物制剂过敏者,妊娠或者哺乳期妇女,HIV、HCV感染者或患者,严重的自身免疫性疾病患者,合并严重感染未控制的患者;合并其他恶性肿瘤者;30 d内参加过其他临床试验的患者,研究者判断的其他不适合入组的患者。

表1 两组患者一般资料的比较[$n(\%)$]

Tab.1 Comparison of the general data between the two groups [$n(\%)$]

Parameters	N	Combination	Chemotherapy	P
Gender				0.301
Male	32	18(60.0)	14(46.7)	
Female	28	12(40.0)	16(53.3)	
Age(t/a)	60	34~72(54)	42~76(54)	0.224
Differentiation				0.668
Well	19	10(33.3)	9(30.0)	
Moderately	15	6(20.0)	9(30.0)	
Poorly	26	14(46.7)	12(40.0)	
TNM stage				0.592
II	22	10(33.3)	12(40.0)	
III	38	20(66.7)	18(60.0)	

1.2 肿瘤细胞抗原的制备

手术切除肿瘤后取肿瘤组织不少于2 g,用生理盐水洗涤后研磨成浆,经胶原酶IV消化后制成肿瘤单细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^6 个/ml,应用淋巴细胞分离液,分离出单个胃癌细胞,制成原代胃癌肿瘤细胞后,经过2或3次传代后收集,生理盐水洗涤3次,溶解裂解法裂解细胞,上清液通过200目网塞过滤收集,储存于 -80 ℃冰箱,做抗原用。

1.3 Ag-DC-CIK细胞的制备

静脉采集观察组患者经造血动员后的外周血

100 ml, 2 000 × g 离心 10 min 后收集血浆,分装后 -20 °C 保存。细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次后重悬,密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),洗涤 3 次,用 GT-T551 无血清培养基重悬细胞,用无血清培养基调整细胞密度使其达到 1 × 10⁶ 个/ml,加入 6 孔板,2 ml/孔,共 2 块,37 °C、5% CO₂ 培养箱贴壁培养 2 h 后吸去未贴壁细胞,贴壁细胞(DC 前体细胞)加入含有人源 GM-CSF 5 ng/ml、人源 IL-4 5 ng/ml 的无血清培养基做 DC 诱导培养,每 2 d 用含上述细胞因子的无血清培养基进行半量换液,第 7 天加入 5 μg/ml 的自体肿瘤抗原,制成自体肿瘤抗原致敏的 DC,第 2 天加入 CD3 单抗(50 ng/ml),每隔 3 d 补加 IL-2(5 ng/ml)。第 7 天将上述两种细胞以 1:10 ~ 1:15 的比例混合后转入 1.8 L 的细胞培养袋中培养即为 Ag-DC-CIK 细胞。7 d 后收集细胞开始进行回输,每天回输 1 次,共 3 次,细胞总数(0.8 ~ 1.3) × 10¹⁰ 个。所有细胞均经过细菌、真菌及内毒素检测为阴性后方可回输。

1.4 治疗方案

化疗方案为 FOLFOX4:5-FU 400 mg/m², 第 1、2 天缓慢静脉滴注;CF 200 mg/m², 第 1、2 天,静脉滴注;L-OHP 85 mg/m²,第 1 天静脉滴注 2 h。上述药物均采用静脉输液泵持续输注给药,21 d 为 1 个化疗周期,所有患者接受 6 个周期化疗。在第一个化疗周期完成后,手术前首次采血,细胞培养完成后回输患者体内,前 3 个化疗周期完成后输注细胞,3 d 为 1 个疗程,每天回输 1 × 10⁹ 个细胞,在 1 h 内输完,连续 3 d 输注,共进行 3 个疗程。

1.5 观察指标与疗效判断

1.5.1 远期疗效评价 电话或者来院复查随访至 2016 年 9 月,以患者术后 24 个月为目标,记录患者复发时间、生存情况。首要研究终点为死亡,次要研究终点为疾病的复发,比较两组患者总生存期(OS)以及无进展生存期(PFS)。

1.5.2 免疫状态的评价 利用细胞流式仪检测 T 细胞亚群,时间点主要为化疗前及 3 个周期细胞免疫治疗完成后检测,主要包括 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD3⁺ CD56⁺ 细胞。

1.5.3 观察患者化疗期间的安全性及化疗药物的毒副作用 包括白细胞及血小板数量;肝功能、肾功能;有无恶心、呕吐及腹泻的发生;细胞回输期间是否有发热、过敏等不良反应的发生。

1.5.4 生活质量评分 随访时根据肿瘤患者生活质量评分表(quality of life, QOL)进行生活质量评分。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件,使用 Kaplan-Meier 方法和 Log-rank 方法分析随访资料。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用卡方检验,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ag-DC-CIK 细胞联合化疗明显提高患者 OS 及 PFS

两组患者在化疗结束后定期复查并随访,通过体检、血液检查、影像学检查及病理学检查结果(图 1、2)显示,联合治疗组患者 OS 为 6 ~ 24 个月,中位 OS 为 16.3 个月,而单纯化疗组的 OS 为 3 ~ 24 个月,中位 OS 为 12.5 个月,差异有统计学意义(*P* < 0.05);联合治疗组患者 PFS 为 6 ~ 24 个月,中位 PFS 为 18.5 个月,而单纯化疗组的 PFS 为 3 ~ 24 个月,中位 PFS 为 14.5 个月,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

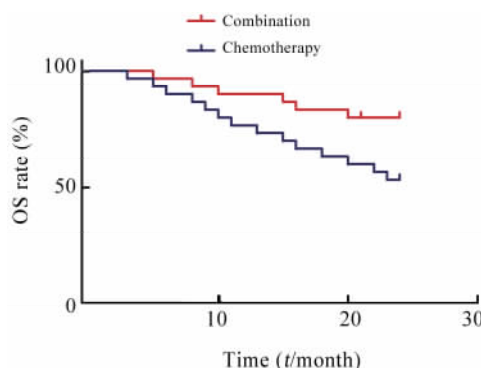


图 1 Ag-DC-CIK 细胞联合化疗提高胃癌患者 OS
Fig.1 Ag-DC-CIK cell therapy in combination with chemotherapy can increase the OS of patients with gastric cancer

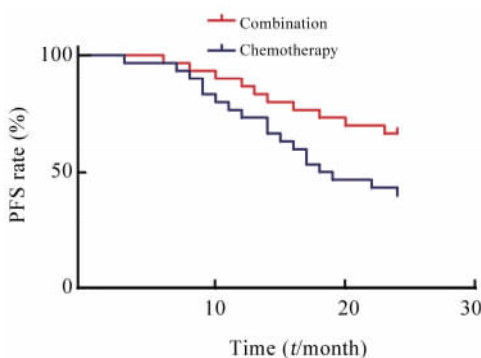


图 2 Ag-DC-CIK 细胞联合化疗提高胃癌患者 PFS
Fig.2 Ag-DC-CIK cell therapy in combination with chemotherapy can increase the PFS of patients with gastric cancer

2.2 Ag-DC-CIK 细胞联合治疗能避免化疗引起的免疫功能损伤

免疫学指标检测结果(表 2)显示,与治疗前相比,联合治疗组免疫学指标未发生明显变化,而单纯化疗组的免疫学指标明显降低($P < 0.05$)。

2.3 Ag-DC-CIK 细胞联合治疗能降低患者对化疗的不良反应率

单纯化疗组有 6 例(20.0%)患者发生不良反应,其中 3 例为白细胞减少,1 例为血小板减少,1 例为恶心呕吐,1 例为腹泻;联合治疗组有 3 例

(10.0%)发生不良反应,其中 2 例为白细胞减少,1 例为恶心呕吐。

2.4 Ag-DC-CIK 细胞联合治疗能明显改善化疗患者的生活质量

治疗前,联合治疗组的综合生活质量评分为(8.23 ± 1.01)分,单纯化疗组为(8.15 ± 1.12)分,两组间无统计学差异($P > 0.05$);治疗后,联合治疗组的综合生活质量评分为(7.25 ± 1.56)分,明显高于单纯化疗组(5.54 ± 1.27)分,两组间差异有统计学($P < 0.05$)。

表 2 两组患者治疗前和治疗 3 个周期后外周血 T 细胞亚群的变化[$n = 30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab.2 Changes of T cell subsets in peripheral blood of patients of two groups [$n = 30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Group	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
Combination				
Pre-therapy	71.4 ± 14.3	38.8 ± 8.26	27.1 ± 7.26	1.46 ± 0.50
Post-therapy	69.9 ± 13.2	37.8 ± 8.96	26.1 ± 6.96	1.39 ± 0.49
Chemotherapy				
Pre-therapy	70.5 ± 13.9	38.1 ± 8.06	28.1 ± 7.38	1.56 ± 0.53
Post-therapy	59.4 ± 10.2*	32.3 ± 5.96*	24.8 ± 4.96*	0.98 ± 0.43*

* $P < 0.05$ vs Pre-therapy of chemotherapy group

3 讨论

恶性肿瘤的发生发展与机体的免疫功能存在着密切的关系,通过激活机体免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤能力能够有效地抑制肿瘤细胞的生长,是免疫治疗肿瘤的重要方法^[4]。近几年来,肿瘤细胞免疫治疗成为恶性肿瘤治疗的一个热点^[5-7]。相比单独使用 DC 或者 CIK 细胞,两者相结合能够高效完成免疫反应,DC-CIK 细胞能够明显增强其抗肿瘤作用,DC 和 CIK 细胞联合后可通过促进分泌细胞因子和显著增强肿瘤细胞周围的效应 T 细胞增殖能力^[8-9]。DC 在 CIK 细胞的活化、增殖、表型的变化和细胞因子的分泌中起着重要的作用,与 DC 共培养后,细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的分泌以及 CD3⁺ CD56⁺ (CIK 的主要效应细胞)的比例显著增加,DC 能显著增强 CIK 细胞的毒性作用^[10]。已经有多项研究^[11-13]表明,DC 在非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌等实体瘤的治疗中具有较大应用前景。另外,选用自身肿瘤细胞抗原去致敏 DC,使细胞免疫治疗做到精确打击肿瘤的目标,起到了个体化治疗肿瘤的目的^[14]。

本研究结果显示,联合治疗组的 OS 及 PFS 都明显高于单纯化疗组,说明 Ag-DC-CIK 细胞联合化疗治疗胃癌 D2 根治术后患者有更好的疗效,且联合治疗组的综合生活质量明显优于对照组,不良反应发生率明显低于对照组。为进一步探讨上述效果与机体免疫的关系,笔者检测了受治患者外周血 T 细胞亚群的变化。外周血 T 细胞亚群是反映机体内细胞免疫状态的重要指标,有研究^[14]显示,行化疗后,外周血 T 细胞亚群水平会明显地下降,Ag-DC-CIK 细胞治疗可以通过释放多种细胞因子来增强免疫调节功能,间接地杀伤肿瘤细胞,降低肿瘤的复发和转移。在本研究中,笔者发现单纯化疗组的 T 细胞亚群水平较化疗前明显下降,而联合治疗组化疗前后 T 细胞亚群水平无明显变化,证实了 Ag-DC-CIK 细胞治疗联合化疗能够明显地增强化疗患者的免疫功能,起到降低肿瘤复发和转移的作用。

综上所述,Ag-DC-CIK 细胞联合化疗治疗胃癌术后,可增强化疗的疗效,维持外周血 T 细胞亚群水平,改善患者的生存质量,为胃癌的细胞免疫治疗提供了新的临床试验数据及新的思路。但本研究仍然有局限性,肿瘤免疫治疗效果与很多因素都相关,

比如肿瘤分期、细胞表型以及治疗细胞的纯化情况等。而且通过诱导和分化,DC-CIK 细胞表型和纯度难以做到统一,加之本组病例数量有限,且无体外细胞学实验等等问题,有待后续研究进一步完善。

[参 考 文 献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10. 3322/caac. 21262.

[2] LAZÁR D C, TÁBAN S, CORNIANU M, et al. New advances in targeted gastric cancer treatment [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(30): 6776-6799. DOI:10. 3748/wjg. v22. i30. 6776.

[3] ERDMAN S E, POUTAHIDIS T. Gut microbiota modulate host immune cells in cancer development and growth [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 5849(16): 31035-31038. DOI:10. 1016/j. freeradbiomed. 2016. 11. 013.

[4] MAHONEY K M, RENNERT P D, FREEMAN G J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(8): 561-584. DOI: 10. 1038/nrd4591.

[5] SCHREIBER R D, OLD L J, SMYTH M J. Cancer immunoeediting: integrating immunity roles in cancer suppression and promotion [J]. Science, 2011, 331(6024): 1565-1570. DOI: 10. 1126/science. 1203486.

[6] 郑劼,江龙委,姚露,等. DC-CIK 细胞治疗晚期结直肠癌的临床疗效 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(4): 459-464. DOI:10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2015. 04. 009.

[7] GAO D, LI C, XIE X, et al. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in gastric and colorectal cancer patients [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e93886 [2017-03-05]. https://www.

ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3974849/. DOI:10. 1371/journal. pone. 0093886.

[8] WALLACE K L, Heng L B, KANAZAWA Y, et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 6-21. DOI:10. 3748/wjg. v20. i1. 6.

[9] JÄKEL C E, SCHMIDT-WOLF I G. An update on new adoptive immunotherapy strategies for solid tumors with cytokine-induced killer cells [J]. Expert Opin Biol Ther, 2014, 14(7): 905-916. DOI:10. 1517/14712598. 2014. 900537.

[10] ZHANG Z, ZHAO X, ZHANG T, et al. Phenotypic characterization and anti-tumor effects of cytokine-induced killer cells derived from cord blood [J]. Cytotherapy, 2015, 17(1): 86-97. DOI: 10. 1016/j. jcyt. 2014. 09. 006.

[11] ZHU X P, XU Y H, ZHOU J, et al. A clinical study evaluating dendritic and cytokine-induced killer cells combined with concurrent radiochemotherapy for stage III B non-small cell lung cancer [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 10228-10235. DOI: 10. 4238/2015.

[12] WANG Z X, CAO J X, WANG M, et al. Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of patients with breast cancer: a meta-analysis [J]. Cytotherapy, 2014, 16(7): 934-945. DOI: 10. 1016/j. jcyt.

[13] CHEN B, LIU L, XU H, et al. Effectiveness of immune therapy combined with chemotherapy on the immune function and recurrence rate of cervical cancer [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 1063-1067. DOI:10. 3892/etm. 2015. 2217.

[14] 高作文,郑劼,娄金书,等. DC-CIK 细胞免疫治疗胃癌的临床疗效及预后分析 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 174-179. DOI:10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2017. 02. 012.

[收稿日期] 2016 - 11 - 20 [修回日期] 2017 - 03 - 13
[本文编辑] 王映红

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 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应标上[文献类型标识代码]或[文献类型标识代码/文献载体标识代码]。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]。对电子资源类文献,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]。现将常用文献类型标识和电子文献载体标识代码列于表 1 作一介绍。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
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		