DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.016

· 短篇论著 ·

DC-CIK 治疗对肾癌患者淋巴细胞亚群的影响

Impact of DC-CIK treatmeat on lymphocyte subsets of patients with renal cell carcinoma

王赛男[1,2],高海燕[2],潘欣[2],廖丽[2],吴春喜[2],吴行伟[1],王丹红[2▲],陈虎[2](1. 解放军军医进修学院,北京 100853; 2. 军事医学科学院附属 307 医院 造血干细胞移植科,北京 100071)

[摘 要] **目的:**观察自体树突状细胞(dendritic cell, DC)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced kill cell, CIK)(DC-CIK)免疫疗法治疗肾癌的近期临床疗效和不良反应,及其对患者外周血淋巴细胞亚群的影响。**方法:**采集 10 例肾癌患者外周血单个核细胞,经体外诱导产生 DC 和 CIK 细胞,分次回输给患者,随访 3 ~ 12 个月,观察患者临床疗效和不良反应。分别于第 1 次治疗前 1 周和每次治疗后 1 个月取患者外周血,流式细胞仪检测其淋巴细胞亚群变化。**结果:**本研究中 6 例晚期肾癌患者接受 1 ~ 3 疗程 DC-CIK 细胞免疫治疗后,完全缓解 1 例,部分缓解 3 例,病情稳定 1 例,疾病进展 1 例;近期有效率为 60%,临床反应率为 90%。治疗前及 1 ~ 3 疗程治疗后患者外周血的 $CD3^+CD4^+CD8^-$、$CD3^+CD4^-CD8^+$、$CD3^+CD19^-$、$CD3^-CD19^+$、$CD3^-CD16^+CD56^+$、$CD3^+CD16^+CD56^+$、$CD3^+$HLA-DR-、$CD3^+$HLA-DR^+、$CD3^+CD28^+CD8^+$ 细胞无明显变化($P>0.05$),$CD4^+CD25^+$T 细胞(Treg 细胞)治疗后有降低趋势($P<0.05$)。除 1 例患者出现一过性发热外,余患者无不良反应。**结论:**DC-CIK 免疫治疗肾癌能改善患者免疫抑制状态,提高机体的抗肿瘤免疫效应,有较好的近期疗效,无明显不良反应。

[关键词] 肾细胞癌;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;临床疗效
[中图分类号] R737.11; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2012)03-0309-04

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,居泌尿系统肿瘤的第二位[1-2]。肾癌具有多重耐药基因,对放、化疗均不敏感,目前仍以手术治疗为主,早期肾细胞癌经手术治疗后 5 年生存率可达 95%,近 1/3 的肾癌患者在确诊时已发生远处转移而无法接受手术治疗,且肾切除术后约 1/3 患者发生转移,晚期肾癌患者 5 年生存率低于 10%[3-6]。目前,肿瘤的生物治疗已被列为继外科、化疗、放疗之后的第四种抗肿瘤治疗模式。生物治疗的应用为转移性肾癌患者开辟了一条新的治疗途径。

肾癌的生物免疫治疗除了传统的 IL-2、IFN-α 等细胞因子为代表的治疗外,以树突状细胞(dendritic cell, DC)、细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced kill cell, CIK)为代表的过继细胞免疫治疗越来越受到关注[7-9]。文献[10-12]报道了应用 DC 或 CIK 细胞治疗肾癌,而 DC-CIK 联合治疗肾癌的报道则较少。本文回顾性分析 307 医院 2010 年 12 月至 2011 年 9 月接受 DC-CIK 细胞免疫治疗的 10 例肾癌患者的临床资料。

1 材料与方法

1.1 临床资料

病例选择标准:组织学或细胞学确诊为肾癌患者;接受过肾癌的规范化治疗包括手术等;末次治疗至开始接受 DC-CIK 治疗的间隔时间至少为 4 周;无法进行手术的中晚期患者,患者预期生存 >3 个月;KPS 评分 >60 分;无严重的病毒、细菌感染;所有患者或由其法定代理人签署了知情同意书,同意进行此免疫治疗。病例排除标准: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;怀孕或哺乳期妇女;存在违反本治疗的体检或实验指标异常者;对生物制品过敏反应者。

10 例肾癌患者均接受过手术治疗,其中男 9 例、女 1 例,年龄 32 ~ 67 岁,中位年龄 54 岁。KPS 评分 80 ~ 90。病理诊断均为透明细胞癌。TNM 分期(参照 UICC 标准)为Ⅰ期 2 例、Ⅱ期 2 例、Ⅳ期 6 例。患者的一般资料见表 1。

1.2 仪器与主要试剂

[基金项目] 国家科技重大专项"十二五"计划项目资助(No. 2009zx09503)。Project supported by the Major Science and Technology Foundation of "Twelve Five-year Plan" of China (No. 2009zx09503)
[作者简介] 王赛男(1985 -),男,黑龙江省绥滨县人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的临床研究。E-mail: wangsainan230@163.com
[通信作者] 陈虎(CHEN Hu, corresponding author), E-mail: chenhu217@yahoo.com.cn; 王丹红(WANG Dan-hong, corresponding author), E-mail: wangdh307@sina.com。▲共同通信作者

倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,FACS Vantage SE 流式细胞仪购自美国 BD 公司,细胞培养箱、A2 生物安全柜购自美国 Thermo 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,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,人血清白蛋白购自奥地利 Baxter AG 公司。

1.3　DC 及 CIK 细胞的分离及培养

费森尤斯细胞分离机无菌采集肿瘤患者抗凝全血 50 ~60 ml,加淋巴细胞分离液制备单个核细胞,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中,培养 3 h,收集悬浮细胞用作 CIK 细胞培养。贴壁细胞加入 GM-CSF 1 000 U/ml、IL-4 500 U/ml,置于 37 ℃、5% 的 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,收集悬浮细胞即为成熟的 DC。将悬浮细胞按 1×10^6/ml 细胞种于培养瓶,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 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$/ml,于第 11 天收集即获 CIK 细胞。

1.4　DC-CIK 免疫治疗方案

所有患者接受专科治疗后,行 DC-CIK 细胞免疫治疗,具体方案:采集细胞当日计为第 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,总细胞数为 $3 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$;第 11、13 天静脉回输 CIK 总细胞数为 $2 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$。

1.5　随访及疗效评价

随访时间从 2010 年 12 月至 2011 年 12 月,患者接受治疗后 1 个月进行原发灶及转移灶的 CT 扫描,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。若患者出现异常症状和体征,随时进行随访复查。临床疗效按实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors,RECIST)分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、病情稳定(stable disease,SD)和疾病进展(progression disease, PD)。不良反应按 WHO(1998)统一标准进行评价,分为 0 ~Ⅳ度。

1.6　淋巴细胞亚群检测

分别于第 1 次 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),应用流式细胞仪检测患者外周血淋巴细胞免疫功能指标 $CD3^+CD4^+CD8^-$、$CD3^+CD4^-CD8^+$、$CD3^+CD19^-$、$CD3^-CD19^+$、$CD3^-CD16^+CD56^+$、$CD3^+CD16^+CD56^+$、$CD3^+$ HLA-DR^-、$CD3^+$ HLA-D^+、$CD3^+CD28^+CD8^+$、$CD3^+CD4^+CD25^+$ 的动态变化。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SASS 9.1 统计软件,对患者接受细胞免疫治疗前后淋巴细胞亚群的变化采用方差分析,$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　近期疗效

10 例患者随访时间 3 ~12 个月,中位随访时间 9.5 个月。近期疗效评价,CR 3 例,PR 3 例,SD 3 例,PD 1 例,近期评价有效的患者一般情况改善明显,生活质量明显提高。其中的 6 例为晚期肾癌患者,接受 1 ~3 疗程免疫治疗后,1 例获得 CR,3 例获得 PR,1 例获得 SD,1 例 PD(表 1)。

2.2　治疗后外周血淋巴细胞亚群变化

动态监测患者接受 1 ~3 疗程 DC-CIK 细胞免疫治疗前后淋巴细胞亚群的变化,与治疗前比较,1 ~3 疗程治疗后 $CD3^+CD4^+CD25^+$ T 细胞计数有明显下降趋势($P < 0.05$); $CD3^+CD4^+CD8^-$、$CD3^+CD4^-CD8^+$、$CD3^+CD19^-$、$CD3^-CD19^+$、$CD3^-CD16^+CD56^+$、$CD3^+CD16^+CD56^+$、$CD3^+$ HLA-DR^-、$CD3^+$HLA-DR^+、$CD3^+CD28^+CD8^+$ 等治疗后无明显变化($P > 0.05$,表 2)。

2.3　DC-CIK 治疗后患者的不良反应

在接受 DC-CIK 细胞免疫治疗的 10 例患者中,未出现明显不良反应,仅有 1 例患者出现一过性发体温升高,但可自行降至正常。

3　讨　论

DC 细胞是目前已知体内功能最强的抗原递呈细胞,能分泌多种细胞因子如肿瘤坏死因子等,诱导细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL),直接或间接影响 B 细胞增殖活性,活化体液免疫应答,在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用;CIK 细胞是一种高效、广谱杀瘤活性的非 MHC 限制性免疫效应细胞,其抗肿瘤的作用的主要机制包括直接杀伤肿瘤细胞及促进 T 淋巴细胞增殖活化等[13]。理论上 DC 细胞与 CIK 细胞的有机结合可产生特异性免疫和非特异性免疫的双重抗肿瘤作用,而且两者与手术、放化疗联合应用,可有效提高机体抗肿瘤作用[14,23],为肾癌患者提供一种有效的治疗手段。

表 1　患者一般资料

病例	性别	年龄	分期	转移部位	既往治疗手段	疗程	疗效	治疗后
1	男	50	Ⅰ	-	手术 + 干扰素	2	CR	CR
2	女	61	Ⅰ	-	手术	3	CR	CR
3	男	54	Ⅱ	-	手术	2	CR	CR
4	男	60	Ⅱ	-	手术	1	CR	CR
5	男	56	Ⅳ	肺	手术	1	PD	SD
6	男	54	Ⅳ	肺、肝	手术 + 干扰素	3	PD	PR
7	男	54	Ⅳ	肺	手术 + 放疗 + IL-2 + 干扰素	3	PD	PR
8	男	32	Ⅳ	肺	手术	2	PD	CR
9	男	48	Ⅳ	肝、肺、脑	手术 + 放疗 + 干扰素	2	PD	PR
10	男	67	Ⅳ	肺	手术	1	PD	PD

表 2　患者治疗前后外周血淋巴细胞亚群的变化

淋巴细胞亚群	治疗前	第 1 疗程后	第 2 疗程后	第 3 疗程后	*P* 值
$CD3^+CD4^+CD8^-$	39.6 ± 8.8	39.5 ± 9.7	38.4 ± 7.9	38.6 ± 6.3	0.9951
$CD3^+CD4^-CD8^+$	24.3 ± 8.0	24.2 ± 8.3	19.6 ± 3.8	20.0 ± 4.2	0.5918
$CD3^+CD19^-$	66.2 ± 9.1	66.1 ± 10.0	61.0 ± 5.1	61.6 ± 3.6	0.6426
$CD3^-CD19^+$	10.6 ± 3.8	10.8 ± 6.1	16.8 ± 9.2	15.1 ± 5.5	0.2323
$CD3^-CD16^+CD56^+$	10.6 ± 6.1	11.3 ± 5.6	7.1 ± 2.9	5.3 ± 3.6	0.2766
$CD3^+CD16^+CD56^+$	4.0 ± 1.7	4.0 ± 2.6	4.3 ± 0.9	5.2 ± 0.9	0.8170
$CD3^+HLA\text{-}DR^-$	55.3 ± 9.5	53.9 ± 6.8	52.0 ± 6.8	54.3 ± 8.8	0.9204
$CD3^+HLA\text{-}DR^+$	10.6 ± 6.1	11.3 ± 5.6	7.1 ± 2.9	5.3 ± 3.6	0.2766
$CD3^+CD28^+CD8^+$	11.7 ± 3.7	11.9 ± 3.7	10.0 ± 5.4	11.3 ± 3.7	0.9157
$CD3^+CD4^+CD25^+$	1.7 ± 0.7	1.3 ± 0.9	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.0323*

* $P < 0.05$ *vs* 治疗前

本研究中的 6 例晚期肾癌患者经 DC-CIK 细胞免疫治疗后,CR 1 例,PR 3 例,SD 1 例,PD 1 例,患者未出现明显不良反应,生活质量明显改善,与文献报道结果相近[8,10,12]。另有文献[15-16]报道,接受细胞免疫治疗的肾癌患者与未接受细胞免疫治疗的患者比较,3 年、5 年 PFS 及 OS 均明显提高。本研究中患者的生存情况尚在随访中。

有研究[17-19]发现,在肿瘤患者及肿瘤动物模型中 Treg 细胞比例的升高与肿瘤的发生、发展密切相关,Treg 可负性调节机体抗肿瘤免疫反应,引起荷瘤机体 T 淋巴细胞功能障碍,抑制效应细胞发挥杀伤作用,有利于肿瘤的生长和转移。有学者[20-21]认为,DC-CIK 联合应用可抑制 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞,增强其对肿瘤细胞的杀伤活性。杨茂、张朝华等[7,22]发现,外周血 Treg 细胞比例下降程度与肾癌患者生存期呈正相关关系($P < 0.01$)。本研究动态监测肾癌患者接受 DC-CIK 治疗前、后外周血 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞,结果发现,$CD4^+CD25^+$ Treg 细胞计数较治疗前显著下降($P < 0.05$),与杨茂、湛海伦[7,14]等的研究结果一致。

外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD56^+$ 等是反应细胞免疫功能的重要指标,晚期肿瘤患者均存在不同程度的免疫缺陷,检测 T 细胞亚群的变化可以评估疾病的进展情况和预后[22]。相关文献[7,8,10]报道,肾癌患者经免疫治疗后,外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD56^+$ 细胞较治疗前有明显升高,改善了患者细胞

免疫抑制状态,提高机体抗肿瘤免疫效应,改善预后,延长患者这生存期($P<0.05$)。本研究动态监测肾癌患者接受 DC-CIK 治疗前、后外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD56^+$ 等细胞计数变化,结果发现,治疗后 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD56^+$ 细胞较治疗前无明显变化($P>0.05$)。分析本研究与其它文献报道不同的原因:1. 免疫治疗中应用的免疫细胞不同,比如单独应用 DC[11]、CIK[8,9,16] 或联合应用 DC-CIK[10,14];2. 肾癌患者接受免疫治疗的时机、治疗疗程及检测外周血淋巴细胞亚群变化的时间不同[8,11,23-24],本研究中肾癌患者多为晚期、多种治疗手段综合治疗后的患者,患者免疫功能有不同程度的抑制,故对免疫治疗的反应不同。本研究动态监测患者治疗前、治疗 1 ~3 疗程后外周血淋巴细胞亚群,未见其明显变化;3. 研究样本量不同,本研究病例数少,需进一步扩充病例数,来更加准确的分析治疗前、后淋巴细胞亚群的变化。

DC-CIK 疗效确切,安全性好,与手术、放疗、化疗的有机结合,可在一定程度上增强机体抗肿瘤免疫作用,控制肿瘤的生长、转移,提高肾癌患者生存质量及生存率。因此,DC-CIK 过继性细胞免疫治疗将逐渐成为实体肿瘤或血液系统肿瘤治疗的新选择。

[参 考 文 献]

[1] 石泓哲, 李长岭. 转移性肾癌的非手术治疗现状[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(1): 74-76.

[2] 郭海滨. 肾癌的非手术治疗现状[J]. 西南军医, 2011, 13 (4): 710-712.

[3] Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Bou Merhi G, et al. Validation and extension of the memorial sloan-kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(4): 832-841.

[4] Garcia JA, Rini BI. Recent progress in the management of advanced renal cell arcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57 (2): 112-125.

[5] Uchida K, Miyao N, Masumori N, et al. Recurrence of renal cell carcinoma more than 5 years after nephrectomy[J]. Int J Urol, 2002, 9(1): 19-23.

[6] Algaba F. Rereading the renal cell tumors[J]. Int J Surg Pathol, 2010, 18(3Suppl): 94S-97S.

[7] 杨茂, 郭志, 司同国, 等. 动脉栓塞联合 CIK 细胞对中晚期肾癌患者免疫功能的影响[J]. 临床放射学杂志, 2011, 30(3): 398-401.

[8] 李霞, 徐文涛, 崔静, 等. CIK 细胞治疗局限性肾癌的疗效[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(8): 950-953.

[9] Su X, Zhang L, Jin L, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(4): 465-470.

[10] 王欢, 周芳坚, 王其京, 等. 负载自体肿瘤细胞裂解物的 DC 疫苗联合 CIK 治疗晚期肾癌的临床观察——附 10 例报告[J]. 癌症 2006, 25(5): 625-630.

[11] 冯磊. 树突状细胞免疫治疗肾癌临床分析[D]. 山东大学硕士学位论文, 2010: 5-30.

[12] 高艳, 曹水, 任秀宝, 等. CIK 细胞治疗转移性肾癌 48 例的疗效预测因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(2): 108-113.

[13] Laschos KA, Papazisis KT, Kontovinis LF, et al. Targeted treatment for metastatic renal cell carcinoma and immune regulation[J]. J BUON, 2010, 15(2): 235-240.

[14] 湛海伦, 高新, 蔡育彬, 等. 腹腔镜肾癌根治术联合 DC-CIK 细胞免疫治疗的临床疗效[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志, 2007, 1(2): 112-116.

[15] 张静, 刘亮, 于津浦, 等. 细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肾细胞癌临床疗效的评价[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18 (5): 480-484.

[16] Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous $CD4^+/CD25^+$ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-β[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 5267-5272.

[17] Sakaguchi S. Naturally arising $CD4^+$ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immuner esponses[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22(5): 531-562.

[18] Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. $CD4^+$ $CD25^{high}$ regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55 (9): 1064-1071.

[19] Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cancer immunotherapy: Co-stimulatory agonists and co-inhibitory an tagonists[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(1): 9-19.

[20] 刘苗, 金润铭, 姜毅. 树突细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞生物学特性和体外杀瘤机制[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(1): 35-38.

[21] 张朝华, 赵春利. 肾癌患者外周血和肿瘤组织内 Treg 细胞比例与预后的关系[J]. 药物研究, 2010, 19(18): 30-31.

[22] 吴登龙, 宋建达, 吴直江. 肾癌患者细胞免疫功能变化的观察[J]. 上海医学, 1996,19(4): 211-213.

[23] 李莉, 宋鑫, 叶联华, 等. CIK 细胞免疫治疗对术后肾癌患者免疫功能的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 11(1): 92-96.

[24] 解燕华, 钟一鸣, 孟明耀, 等. CIK 细胞治疗泌尿系统肿瘤的临床疗效分析[J]. 昆明医学院学报, 2011, 12(1): 108-111.

[收稿日期] 2012 - 01 - 29　　[修回日期] 2012 - 04 - 06
[本文编辑] 韩丹