

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.013

DC-CIK 细胞联合手术治疗原发性肝癌的临床研究

马洪波, 黄 涛, 韩 风, 陈伟瑜

(河南省肿瘤医院肝胆胰外科, 郑州 450008)

【摘要】目的:评价树突状细胞(Dendritic cells, DC)-细胞因子激活的杀伤细胞(Cytokine induced killer, CIK)即 DC-CIK 细胞联合手术治疗原发性肝癌的临床疗效。方法:将 67 例原发性肝癌患者随机分为治疗组和对照组,治疗组 34 例,行肝癌切除术,术后给予 DC-CIK 细胞治疗。对照组 33 例,行肝癌切除术。治疗结束后比较 2 组的免疫功能、生活质量、生存率、肿瘤复发率及不良反应。结果:治疗组 DC-CIK 细胞治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD16⁺CD56⁺和 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显上升,CD8⁺ 效应细胞比例下降,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,治疗组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD16⁺CD56⁺和 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著上升,CD8⁺效应细胞比例显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗组有 61.8% 的患者生活质量得到改善,明显高于对照组的 36.4% ($P<0.05$)。治疗组的 1 年生存率为 91.2%,对照率为 81.8%,治疗组的 1 年复发率为 8.8%,对照率为 15.2%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。自体 DC-CIK 细胞治疗常见的副反应为发热、寒颤,对症处理后均可缓解。结论:DC-CIK 细胞联合手术治疗原发性肝癌安全有效,对提高肝癌患者的免疫功能,改善患者生活质量,提高治疗效果具有重要作用。

【关键词】树突状细胞;细胞因子激活的杀伤细胞;肝肿瘤;肝切除术

【中国图书分类法分类号】R322.4⁺7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-06

DC-CIK cells combined with surgical treatment for hepatocellular carcinoma

MA Hongbo, HUANG Tao, HAN Feng, CHEN Weiyu

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Cancer Hospital of Henan Province)

【Abstract】Objective: To evaluate the clinical efficacy of dendritic cells-cytokine induced killer (DC-CIK) cells combined with surgical treatment for hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** Totally 67 patients with HCC were randomly divided into treatment group ($n=34$) and control group ($n=33$). The patients in control group were received hepatectomy while those in treatment group were given hepatectomy combined with DC-CIK cell treatment. The immune function, quality of life, tumor recurrence rate and adverse reactions were analyzed postoperatively. **Results:** In treatment group, the proportion of CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺CD56⁺ and the ratio of CD4⁺ against CD8⁺ were increased and the proportion of CD8⁺ effect cells was decreased significantly after DC-CIK cell treatment compared with those before DC-CIK cell treatment, with statistical differences ($P<0.05$). After treatment, the proportion of CD3⁺, CD4⁺, CD16⁺CD56⁺ and the ratio of CD4⁺ against CD8⁺ were increased and the proportion of CD8⁺ effect cells was decreased significantly in treatment group compared with those in control group, with statistical differences ($P<0.05$). Quality of life of 61.8% patients in treatment group was improved, significantly higher than that of 36.4% in control group ($P<0.05$). The 1-year survival rate and 1-year recurrence rate in treatment group and control group were 91.2% vs. 81.8% and 8.8% vs. 15.2% respectively, with no significant statistical difference between two groups ($P>0.05$). The side effects of DC-CIK cells treatment were fever, chills and could be alleviated after symptomatic treatment. **Conclusions:** DC-CIK cells combined with surgical treatment for patients with hepatocellular carcinoma is safe and effective and it plays an important role in improving immune function and quality of life of HCC patients.

【Key words】 dendritic cells; cytokine induced killer cells; liver neoplasm; hepatectomy

手术是目前治疗原发性肝癌的主要方法,但是手术的创伤往往使患者术后的免疫功能受损,生活质量下降,术后恢复较慢,且体内存在的微小转移灶往往成为复发的主要来源。树突状细胞(Dendritic cells, DC)是目前发现的功能最强的专职抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC),能够诱导机

体产生持久有力的特异性抗肿瘤免疫反应。细胞因子激活的杀伤细胞(Cytokine induced killer, CIK)细胞能提高机体免疫力,清除肿瘤患者体内微小残余病灶。DC 和 CIK 细胞在抗肿瘤细胞中有一定的互补作用,已成为肝癌的一种新的治疗手段^[1]。本研究通过肝癌患者术后回输 DC-CIK 细胞免疫治疗意在探讨手术联合 DC-CIK 细胞治疗原发性肝癌的临床疗效。

作者简介:马洪波(1973-),男,主治医师,
研究方向:肝胆胰疾病的治疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选自 2008 年 9 月至 2010 年 9 月于我院治疗的经病理或临床证实的原发性肝癌患者 67 例,年龄 35~77 岁,平均年龄 44.3 岁,经医院伦理委员会批准并应用抽签法将入组患者随机分为治疗组和对照组,治疗组 34 例,先行肝癌切除术,后给予 DC-CIK 细胞治疗,对照组 33 例,行肝癌切除术。患者具体入组标准为:①所有患者肝功能为 Child-Pugh A 级或 B 级;②肝内肿块直径为 3~15 cm,无门脉癌栓及肝内和远处转移;③肝肾功、血糖、心电图及 HBV-DNA 基本正常,无手术禁忌证;④预计生存时间 $\geq$ 半年;⑤患者或家属签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:rh-IFN- γ 、CD3McAb、rh-IL-2、rh-IL-4、rh-GM-CSF(均为 R&D 公司产品);抗 CD3-PE、抗 CD4-PE、抗 CD16-PE、抗 56-PE、抗 CD8-PE(均为美国 BD 公司产品);MDM、DMEM、Ficoll 液、T 细胞亚群试剂盒(均为美国 Sigma 公司产品)。仪器:无血清培养基 AIMV(美国 Invitrogen 公司产品);CO₂ 恒温培养箱;流式细胞仪。

1.3 DC-CIK 细胞的培养

术前 1 周左右通过血细胞分离机采集治疗组患者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMNC)约 40 ml,用 Ficoll 淋巴细胞分离液进一步分离纯化,用 AIMV 无血清培养基调整细胞浓度为 $(4\sim6)\times 10^6$ 个/ml,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 2 h。收集非贴壁细胞和贴壁细胞,将非贴壁细胞计数并用含 10% 人 AB 血清的 MDM 调整细胞浓度,然后分别加入 IFN- γ 、CD3McAb 及白介素-2(Interleukin, IL-2),继续培养至第 8 天获得 CIK 细胞。将贴壁细胞计数并分别加入粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、白介素-4(Interleukin-4, IL-4)培养至第 8 天获得 DC 细胞,然后将 CIK 细胞和 DC 细胞按 1:5 的比例混合继续培养 3 d 获得 DC-CIK 细胞。

1.4 治疗方案

手术治疗:所有患者入院后进行围术期的术前评估,评估按肝切除标准能够保证剩余肝组织代偿功能,为减少术中出血采取第一肝门阻断加降低中心静脉压的方法,阻断第一肝门时间一般不超过 15 min,解除阻断 5 min 后可再次阻断,阻断次数 1~4 次,对于肝硬化严重的患者可减少阻断次数,中心静脉压一般控制在 3~4 cm H₂O,术后给予保肝、利胆、利尿、控制感染及营养支持治疗。DC-CIK 细胞治疗:以采血之日作为第 1 天,培养至 14 d 时取少量 DC-CIK 细胞对其进行细菌、真菌及内毒素检测,并检测其表面标志,然后将细胞混悬于生理盐水中,用输血器回输给患者,每次输注细胞数约为 $(1.5\sim6.3)\times 10^9$ 个,1 d 1 次,连输 3 d。

1.5 观测指标及疗效判定

观察指标包括免疫功能、生活质量、生存率、肿瘤复发率及不良反应,术后每 2 个月复查 1 次肝脏 CT 或 B 超。DC-CIK 细胞治疗前及治疗后 2 周,用流式细胞仪检测患者外周

血 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)和 NK 细胞(CD16⁺、CD56⁺)变化,对照组在相同的时间行 T 细胞亚群检测。应用 Karnofsky 评分评价患者生活质量评分(Quality of life, QOL)^[2]变化,以治疗后 KPS 增加 ≥ 10 分为 QOL 改善,变化 < 10 分为 QOL 稳定,减少 ≥ 10 分为 QOL 降低。细胞回输过程中,观察患者有无过敏、休克等不良反应。

1.6 统计学处理

采用统计软件 SPSS 15.0 进行统计学处理,率和构成比的比较采用 χ^2 检验,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患者一般资料比较

经统计学检验,治疗组和对照组患者的一般资料具有可比性(表 1)。

表 1 治疗组和对照组患者一般资料比较

Tab.1 Comparison on the general information between treatment group and control group

项目	治疗组(n=34)	对照组(n=33)	χ^2 值	P 值
性别				
男	24	27	1.162	0.281
女	10	6		
年龄(岁)				
35~	11	14	1.196	0.550
51~	16	15		
≥ 65	7	4		
KPS 评分				
≥ 90	18	20	1.002	0.606
80	12	8		
70	4	5		
HbsAg 阳性	31	32	1.001	0.317
合并肝硬化	28	30	1.054	0.305
AFP(μ g/L)				
≥ 400	30	26	1.089	0.297
< 400	4	7		
Child-Pugh 分级				
A 级	28	24	0.893	0.345
B 级	6	9		
肿瘤位置				
肝左叶	19	20	0.154	0.695
肝右叶	15	13		
肿瘤数目				
1 个	16	13	0.421	0.810
2 个	15	17		
≥ 3 个	3	3		
肿瘤最大直径				
1~3 cm	21	24	0.913	0.339
> 3 cm	13	9		

2.2 T 细胞亚群变化

治疗组 T 细胞亚群中的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK(CD16⁺CD56⁺) 显著上升, T 细胞亚群中的 CD8⁺ 下降, 治疗前后差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组治疗后比较, 治疗组治疗后 T 细胞亚群中的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 NK(CD16⁺CD56⁺) 显著上升, T 细胞亚群中的 CD8⁺ 效应细胞比例显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 生活质量改变

治疗组行 DC-CIK 细胞治疗结束后, QOL 评分改善 21 例 (61.8%), 与对照组改善率 36.4% 比较差异有统计学意义 ($Z = -2.069, P = 0.039$)。见表 3。

2.4 生存率及肿瘤复发率

随访 1 年, 2 组患者随访率为 100%, 随访至 1 年时治疗组患者存活 31 例, 1 年生存率为 91.2%, 对照组存活 27 例, 1 年生存率为 81.8%, 2 组患者的 1 年生存率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.272, P = 0.254$)。治疗组有 3 例出现复发, 复发率为 8.8%, 对照组有 5 例出现复发, 复发率为 15.2%, 2 组患者的复发率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.683, P = 0.425$)。

2.5 死亡原因与不良反应

治疗组 3 例死亡患者中, 其中 2 例死于肝硬化所致上消化道大出血, 1 例死于肝昏迷。对照组 6 例死亡患者中, 1 例死于肝内肿瘤增大所致肝破裂, 2 例死于肝硬化所致上消化道大出血, 1 例死于肝性脑病, 1 例死于肝癌肺转移, 1 例死

于肝癌脑转移。2 组患者的手术并发症主要为术后出血、膈下积液、胸腔积液、胆漏及肝昏迷, 2 组患者的发生率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。治疗组有 4 例 (11.8%) 患者输注 DC-CIK 细胞后出现寒颤、发热, 给予对症处理后 24 h 内恢复正常, 未出现肝功能、肾功能损伤及骨髓抑制等不良反应。

3 讨论

随着肝脏外科技术的不断发展, 肝切除的适应证进一步扩大, 手术死亡率明显下降, 然而原发性肝癌患者的术后局部复发率较高, 总体生存率无显著提高, 考虑可能与机体内存在的微小转移灶有关。因肝癌的发生与机体的免疫功能下降密切相关, 同时肝癌是一种免疫相关性肿瘤, 因此, 如何将肝癌免疫治疗与手术治疗结合起来成为预防肝癌术后复发, 提高生存率的关键所在^[3]。

众所周知, DC 细胞是机体免疫应答的“启动者”, 它能刺激记忆 T 细胞活化、调控机体体液免疫应答及诱导再次免疫应答^[4]。CIK 细胞是一种非组织相容复合物限制性的细胞毒性 T 细胞, 能在体外被

表 2 治疗组和对照组治疗前后 T 细胞亚群和 NK 细胞比较

组别		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ CD56 ⁺
治疗组	治疗前	63.95 ± 2.41	31.98 ± 3.47	31.54 ± 2.47	1.01 ± 1.40	14.27 ± 2.21
	治疗后	68.33 ± 1.89	37.17 ± 5.06	24.26 ± 5.34	1.53 ± 0.94	18.36 ± 3.01
	<i>t</i> 值	2.78	3.34	3.89	4.13	3.97
	<i>P</i> 值	0.042	0.004	0.024	0.018	0.021
治疗组治疗前后比较						
对照组	治疗前	63.35 ± 5.37	33.64 ± 4.17	32.04 ± 4.25	1.04 ± 0.98	13.87 ± 3.87
	治疗后	64.27 ± 2.48	32.69 ± 0.28	32.31 ± 7.01	1.01 ± 0.04	14.11 ± 2.02
治疗组与对照组治疗	<i>t</i> 值	2.81	3.39	3.78	4.11	3.76
	<i>P</i> 值	0.046	0.038	0.020	0.015	0.018
后比较						

表 3 治疗组和对照组治疗前后生活质量比较

组别	例数 (<i>n</i>)	改善	稳定	降低	统计量 <i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
治疗组	34	21 (61.8%)	10 (29.4%)	3 (8.8%)	-2.069	0.039
对照组	33	12 (36.4%)	15 (45.5%)	6 (18.2%)		

表 4 治疗组和对照组术后并发症比较

并发症	治疗组	对照组	χ^2 值	<i>P</i> 值
术后出血	3 (8.8%)	2 (6.1%)	0.185	0.667
膈下积液	2 (5.9%)	3 (9.1%)	0.250	0.617
胸腔积液	1 (2.9%)	1 (3.0%)	0.000	1.000
胆漏	1 (2.9%)	2 (6.1%)	0.381	0.537
肝昏迷	0 (0.0%)	1 (3.0%)	1.046	1.000

诱导并大量增殖,杀瘤活性强、杀瘤谱广^[5]。研究发现 DC 细胞刺激 CIK 细胞后,细胞毒活性显著增强。两者联合应用治疗恶性肿瘤,将有望起到协同作用。

机体抗肿瘤免疫效应中以细胞免疫为主,细胞免疫应答主要是 T 细胞介导的特异性抗肿瘤免疫应答,根据 T 细胞表面分化抗原将成熟 T 细胞分为 CD4 辅助/诱导 T 细胞、CD8 抑制/杀伤 T 细胞。通常情况下,CD4⁺/CD8⁺T 的比值在 1.5~2.0 之间,肿瘤患者因机体免疫监视功能降低,常表现 CD4⁺T 下降,CD8⁺T 上升,CD4⁺/CD8⁺比值下降,甚至倒置^[6]。CD16 和 CD56 是 NK 细胞的表面标志,其表达下降提示机体 NK 细胞作用受抑制,细胞免疫功能下降,不能发挥有效杀伤肿瘤细胞的作用。因此改善肝癌患者的免疫功能显得尤其重要。王欢等^[7]用负载自体肿瘤细胞裂解物的 DC 疫苗联合 CIK 治疗 10 例晚期肾癌患者,结果患者的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD16⁺CD56⁺均明显升高,说明机体的特异性和非特异性的细胞免疫功能明显提高,本研究得出了类似的结论,说明经 DC-CIK 细胞治疗后肝癌患者的免疫力得到了提高。

王娟等^[8]应用 DC-CIK 细胞治疗 13 例恶性肿瘤患者,除 1 例肝癌骨转移患者经治疗无效死亡外,其余患者的临床症状、影像学均提示病变较前好转。杨涛等^[9]应用 DC-CIK 细胞治疗 110 例晚期实体瘤患者,结果 42 例可评价病灶的患者中,2 例完全缓解,9 例部分缓解,15 例疾病稳定,37 例不可评价病灶的患者中,25 例患者有效,与治疗前相比,治疗后免疫功能及肿瘤标志物有一定程度改善。本研究中治疗组的 1 年生存率略高于对照组,1 年复发率略低于对照组,说明 DC-CIK 细胞治疗起到了杀伤肝癌细胞的作用,由于 2 组的 1 年生存率和复发率比较无明显差异,考虑可能与观察时间较短有一定的关系,随着随访时间的延长,治疗组的远期疗效可能会优于对照组。

本研究发现,DC-CIK 细胞免疫治疗联合手术提高了术后肝癌患者的免疫力,改善了患者的生活质量,在一定程度(这里写的是在一定程度上延长了,结果部分治疗组的 1 年生存率高于对照组,复发率低于对照组,虽然没有差异,可能与随访时间较短有关,所以这里说“一定程度上”,并没有夸大结论的意思)上延长了生存期,降低了复发率,且副

作用较小,是肝癌的一种有效的治疗方法,值得临床进一步推广。

参 考 文 献

- [1] Pang J, Gao X, Liu X, et al. Enhanced antitumor effects by the co-culture of allotumor RNA-pulsed dendritic cells with autologous cytokine-induced killer cells on hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer Invest, 2007, 25(7): 527-534.
- [2] 谭诗生, 李杭, 罗健, 等. 欧洲癌症研究与治疗组织研制的生活质量核心调查问卷第 3 版中文版: 生活质量调查问卷测评[J]. 中国临床康复, 2006, 10(4): 23-27.
- [3] Tan S S, Li H, Luo J, et al. The quality of life core questionnaire developed by the European cancer research and treatment organizations: the quality of life questionnaire assessment, 3rd edition Chinese version[J]. Clinical Rehabilitation, 2006, 10(4): 23-27.
- [4] Hontscha C, Borek Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 305-310.
- [5] Kim J Y, Park M S, Ji G E. Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(12): 1308-1318.
- [6] Lin G, Wang J, Lao X, 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.
- [7] Chen J, Huang X, Huang G, et al. Preconditioning chemotherapy with Cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(3): 210-220.
- [8] 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.
- [9] Wang H, Zhou F J, Wang Q J, et al. Load autologous tumor lysate DC vaccine combined with the clinical observation of CIK treatment for advanced renal cell carcinoma-report of 10 cases[J]. Chinese Journal of Cancer, 2006, 25(5): 625-630.
- [10] 王娟, 陶贞霞, 刘荣英, 等. DC-CIK 细胞免疫治疗恶性肿瘤的临床研究[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(1): 71-74.
- [11] Wang J, Tao Z X, Liu R Y, et al. Study of the DC-CIK cell immunotherapy for malignant tumor[J]. Journal of Immunology, 2009, 25(1): 71-74.
- [12] 杨涛, 邵江河, 李启英, 等. 树突状细胞联合 CIK 细胞应用于晚期恶性实体瘤治疗的临床疗效观察[J]. 肿瘤, 2010, 30(8): 700-705.
- [13] Yang T, Shao J H, Li Q Y, et al. The clinical efficacy of dendritic cells in combination with CIK cells used in the treatment of advanced malignant solid tumors[J]. Tumor, 2010, 30(8): 700-705.

(责任编辑: 冉明会)