

结直肠癌化疗联合自体多种免疫细胞治疗疗效观察

朱云¹, 刘军权², 张南征¹, 陈复兴², 陈玲², 张颂², 杨宛莹¹, 周忠海², 徐永茂¹

(1. 中国人民解放军第九七医院消化内科, 江苏 徐州 221004; 2. 中国人民解放军第九七医院生物治疗中心)

摘要:目的 比较结直肠癌患者自体多种免疫细胞联合化疗与单纯化疗后细胞免疫功能变化和生存期差异。方法 83例结直肠癌患者分为化疗组43例, 化疗联合自身多种免疫细胞治疗组(联合组)40例; 用血细胞分离机采集患者自身外周血单个核细胞(PBMC), 将PBMC按常规方法分别诱导培养CD3AK细胞、CIK细胞、树突状细胞(DC)、 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞; 用流式细胞仪检测治疗前后患者外周血的CD3(+)、CD4(+)、CD8(+)、CD19(+)、CD16(+), CD56(+), CD4/CD8和 $\gamma\delta$ T细胞比值及PBMC中穿孔素、颗粒酶B和CD107a阳性表达率。2组患者化疗方案都采用草酸铂+亚叶酸钙+5-氟脲嘧啶静脉输注; 联合组在化疗基础上接受免疫细胞治疗。结果 联合组治疗后的免疫细胞亚群比值和绝对值显著高于化疗组。联合组与化疗组Karnofsky评分差异有统计学意义。联合组患者治疗后PBMC的穿孔素、颗粒酶B及CD107a均高于治疗前, 并且治疗后这3种指标数值均显著高于化疗组。联合组患者1年、2年和5年生存率分别为70.0%、20.0%和10.0%, 高于化疗组(分别为23.2%、7.0%和4.6%); 其中II期、III期患者的1年、2年和5年生存率及IV期患者的1年生存率2组间比较差异有统计学意义, 而IV期患者的2年、5年生存率2组间比较差异无统计学意义。结论 化疗联合自身综合性免疫细胞治疗进展期结直肠癌能提高患者的免疫功能, 延长生存期。

关键词: 结直肠癌; 综合性过继免疫治疗; 免疫功能; 免疫细胞

中图分类号: R735.3; R730.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2065(2011)09-0631-06

Clinical effects of treatment with comprehensive multiple autologous immune cells in patients with colorectal carcinoma

ZHU Yun¹, LIU Junquan², ZHANG Nanzheng¹, CHEN Fuxing², CHEN Ling², ZHANG Song²,
YANG Wanying¹, ZHOU Zhonghai², XU Yongmao¹

(1. Department of Gastroenterology, The 97th Hospital of PLA, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;

2. Department of Biological Treatment Center, The 97th Hospital of PLA)

Abstract: **Objective** To compare the changes of immune functions and survival time in patients with colorectal carcinoma after the treatments of adoptive immunotherapy with comprehensive multiple autologous immune cells combined with chemotherapy and chemotherapy alone. **Methods** Eighty-three patients with colorectal carcinoma were randomized into chemotherapy group ($n=43$) and chemotherapy combined with comprehensive adoptive immunotherapy group ($n=40$). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the patients were collected by blood cell separator and separately cultured into CD3AK, CIK, dendritic cell (DC), $\gamma\delta$ T, NK and NKT cells by conventional methods; cell ratios of CD3(+), CD4(+), CD8(+), CD19(+), CD16(+), CD56(+), CD4/CD8 and $\gamma\delta$ T in peripheral blood and positive expression rates of perforin, granzyme B and CD107a in PBMC before and after treatment were detected by flow cytometry. **Treatment:** the chemotherapy regimen of all the patients was oxaliplatin plus CF and 5-FU, on the basis of chemotherapy, combination group accepted comprehensive autologous adoptive immunotherapy. **Results** After the treatment, the immunocyte subsets of combination group were significantly higher than those of chemotherapy group. The scores of Karnofsky in both groups were statistically significant. After the treatments, the positive rates of perforin, granzyme B and CD107a in combination group were obviously elevated and higher than those of chemotherapy group. The overall 1, 2 and 5-year survival rates of patients (stage II, III and IV) in combination group were 70.0%, 20.0% and 10.0%, higher than those of chemotherapy group (23.2%, 7.0% and 4.6%, respectively). Between the two groups, significant difference was found on 1, 2 and 5-year survival rate of stage II, III patients and 1-year survival rate of stage IV patients, no significant difference was found in 2 and 5-year survival rate of stage IV patients. **Conclusion** For advanced colorectal carcinoma patients, chemotherapy combined with comprehensive autologous adoptive immunotherapy can enhance their immunological function and prolong their survival duration.

Key words: colorectal carcinoma; adoptive immunotherapy; immune function; immune cells

结直肠癌(CRC)是消化道常见恶性肿瘤。在我国,CRC 分别位居肿瘤相关疾病发病率和病死率第5和第6位。目前,手术仍为结直肠癌治疗的首选。但是有许多进展期患者不宜手术,这些患者机体往往存在严重的细胞免疫功能缺陷。为提高肿瘤患者细胞免疫功能,本研究将体外扩增的综合性自身免疫细胞[CD3AK 细胞、细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced kill, CIK)、树突状细胞(dendritic cell, DC)、NK 细胞和 DC 荷载 α -GalCer 及 $\gamma\delta$ T 细胞等]回输治疗进展期结肠癌患者,并采用多指标观察治疗前后患者免疫细胞功能改变与生存期的关系。

1 资料和方法

1.1 临床资料 病例筛选标准:①国际抗癌联盟(UICC)结直肠癌 TNM 分期为Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期;②术前未接受过化疗或放疗;③年龄 30~80 岁;④患

者无严重心、肺、肝、肾等内科疾病;⑤病理证实均为腺癌。

按入选标准选取 2000 年 1 月—2007 年 1 月间于我院接受治疗的结直肠癌患者 83 例。其中结肠癌 48 例,直肠癌 35 例;男 51 例,女 32 例;平均年龄(58.3 ± 13.6)岁。病理检查:高分化腺癌 25 例,中分化腺癌 23 例,低分化腺癌 24 例,黏液腺癌 11 例。按照 UICC 结直肠癌 TNM 分期:Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 28 例,Ⅳ期 26 例。

按照治疗方案分为 2 组:①化疗组,43 例,其中Ⅱ期 15 例、Ⅲ期 15 例、Ⅳ期 13 例,仅进行化疗;②联合组,40 例,其中Ⅱ期 14 例、Ⅲ期 13 例、Ⅳ期 13 例,进行化疗联合细胞免疫治疗。

所有患者治疗之前均明确告知本治疗的优点和不足,患者或家属签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。2 组间一般情况比较无统计学差异,见表 1。

表 1 2 组临床资料一般情况比较(例)

组别	n	性别		年龄(岁)	TNM 分期			病理类型(腺癌)			
		男	女		Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	高分化	中分化	低分化	黏液
化疗组	43	27	16	58.3 ± 12.0	15	15	13	13	12	12	6
联合组	40	24	16	59.2 ± 12.7	14	13	13	12	11	12	5

1.2 仪器及试剂 重组人白细胞介素(rhIL)-2、rhIL-4rh、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和重组人 γ 干扰素(rhIFN- γ)(厦门特宝生物工程股份有限公司),人 CD3 单克隆、胎牛血清、RPMI 1640(美国 Gibco 公司),淋巴细胞分离液(中国科学院血液病研究所),人 AB 型血清(徐州市血站),NK 细胞培养基(CellGro SCGM, D-79108, Freiburge/Germany),荧光标记的单抗和同型对照抗体 FITC-m IgG1、PE-m IgF2a (DB 公司和 PHarminggen 公司),CD3、CD4、CD8、CD25、CD16/CD56 单克隆抗体(美国 DB 公司)。FITC 标记的 Anti-TCR- $\gamma\delta$ 、PE 标记的穿孔素(perforin)、颗粒酶 B (GranB)、APC 标记的 CD107a 及 Fix&Perm 破膜剂均购自 Ebioscience 公司,IPP、LPS(脂多糖)(Sigma 公司)。流式细胞仪(美国 DB 公司,分析软件为 Elite),每个标本分析细胞数 $\geq 1 \times 10^4$ 。

1.3 自身免疫细胞的制备

1.3.1 树突状细胞制备 用 Baxter CS-3000 血细胞分离机分离患者外周血单个核细胞(PBMC),采集血液总量 4 000~5 000 ml,获取的 PBMC(含有部分红细胞)数为 $2.0 \times 10^9 \sim 4.5 \times 10^9$,在进行 PBMC

采集时留取 100 ml 自身血浆在细胞回输时应用。将采集的 PBMC 离心,弃上清,加入等量 pH=7.4 的 PBS 将 PBMC 悬浮后加入淋巴细胞分离液上,以 2 000 r/min 离心 15 min,吸取单个核细胞层,用生理盐水洗涤 3 遍(1 500 r/min 离心,10 min/次),将细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 配成密度为 1×10^9 个/L 的细胞悬液。按常规贴壁法选用贴壁细胞进行 DC 培养,悬浮的 PBMC 用于其他细胞培养。在培养第 7 天的 DC 中加入 IFN- γ 2×10^6 U/L、LPS 3 μ g/L,9 天时即成为成熟的 DC,进行细菌和霉菌培养,阴性,收集细胞,经无菌生理盐水洗 3 次后将 DC 悬于 2 ml 自身血浆中,供患者浅表淋巴结或皮下注射。做 3 次以上 DC 治疗者进行 1 次静脉回输。

1.3.2 CIK 细胞诱导 获得的患者 PBMC 按 1×10^9 /L 数量悬浮于 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清、5% AB 血清和 IFN- γ 1×10^6 U/L)中,加入 GT-T503 细胞培养袋(2 000 ml/袋)内,置 37℃、5% CO₂ 环境下培养 24 h 后加入 CD3 单克隆抗体至 1 mg/L、rhIL-2 2×10^5 U/L。继续 37℃、5% CO₂ 环境下培养。培养第 7 天时进行细菌和霉菌培养,阴

性,收集细胞,经无菌生理盐水洗3次后将细胞悬浮于100 ml自身血浆中,并加入rhIL-2至 5×10^5 U/L,用输血器回输给患者,2 h内输完。

1.3.3 CD3AK细胞诱导 获得的患者PBMC按 1×10^9 /L数量悬浮于RPMI 1640培养基(含10%小牛血清、5% AB血清、CD3单克隆抗体1 mg/L和IL-2 2×10^5 U/L)中,加入GT-T503细胞培养袋(2 000 ml/袋)内,置37℃、5% CO₂环境下培养。培养第6天时进行细菌和霉菌培养,检测阴性后按上述方法收集和回输细胞。

1.3.4 $\gamma\delta$ T细胞的培养和鉴定 获得的PBMC按 1×10^9 /L数量悬浮于RPMI 1640培养基(含3%人自身血清、rhIL-2 1×10^5 U/L和IPP 3 mg/L)中,加入GT-T503细胞培养袋(2 000 ml/袋)内。收集培养10天的贴壁生长细胞进行抗人TCR- $\gamma\delta$ -FITC表面标志检测,用于治疗的 $\gamma\delta$ T细胞进行细菌和霉菌培养,阴性,按上述方法收集和回输细胞。

1.3.5 α -GalCer荷载于DC细胞 将 α -GalCere用二甲基亚砜(DMSO)配至浓度0.1 g/L,震荡 α -GalCer液,37℃、12 h;用之前37℃超声水浴10 min;收集培养6天的DC细胞加入上述 α -GalCer液,至最终浓度为0.1 mg/L,将上述二者的混合液于37℃、5% CO₂环境培养,避光孵育24~48 h。然后按上述方法收集和回输细胞。

1.3.6 NK细胞的诱导及扩增 按上述方法分离患者外周血PBMC,用NK细胞培养液(含10%胎牛血清、2 mmol/L谷胺酰胺、20 mmol/L HEPES缓冲液、青链双抗)将细胞配成 5×10^8 /L的细胞悬液,平分于2个150 ml塑料细胞培养瓶,置37℃、5% CO₂培养箱中培养,隔天换液并调整细胞密度至 1×10^9 /L,培养10天后按上述方法收集和回输细胞。

1.4 免疫细胞回输方案 采集的细胞经培养后按不同细胞类型分别回输,8~12次为1个疗程(DC 3~5次),回输细胞总数为 1.1×10^{10} ~ 8.0×10^{10} 。除少数病情严重者1个月后行第2次治疗外,多数患者均在3个月后行第2次治疗。每例患者每个疗程的成熟DC细胞总数为 3×10^7 ~ 7×10^7 。

1.5 化疗方法 2组患者化疗方案都采用草酸铂+亚叶酸钙(CF)+5-氟尿嘧啶(5-FU)静脉输注。草酸铂100 mg/m²,2 h,第1天;CF 100 mg/m²,2 h(先用);5-FU 500 mg/m²,6 h以上(后用),第1~5天。每4周为1个治疗周期。其中化疗组3例治疗1个周期,10例治疗2个周期,30例治疗6个周期。联合组3例治疗2个周期,8例治疗3个周

期,29例治疗6个周期。

1.6 细胞免疫治疗方案 各免疫细胞按上述方法回输。联合组40例患者中4例接受3个疗程,6例接受6个疗程,9例接受7个疗程,11例接受10个疗程,10例接受16个疗程以上治疗。

1.7 观察指标及疗效判定

1.7.1 治疗前后免疫细胞亚群检测 于治疗前及治疗结束后1周抽取患者外周血3 ml,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,细胞经PBS洗涤后配制成 1×10^{10} /L,每管各取100 μ l,采用流式细胞仪按试剂说明书要求检测患者外周血中CD3(+),CD4(+),CD8(+),CD19(+),CD16(+),CD56(+),CD4/CD8和 $\gamma\delta$ T细胞的变化。

1.7.2 PBMC中perforin、GranB及CD107a表达的检测 抽取患者治疗前后外周血3 ml,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液分离PBMC,细胞经PBS洗涤后配制成 10^{10} /L,每管各取100 μ l,分别加入Anti-TCR- $\gamma\delta$ 、Fix&Perm破膜剂、perforin、GranB、APC标记的CD107a,孵育、洗涤后用流式细胞仪检测和分析细胞。

1.7.3 肿瘤标志物癌胚抗原(CEA) 采集患者治疗前后外周血,用电化学发光法按试剂操作说明书测定血清中CEA含量。

1.7.4 Karnofsky评分 治疗前后分别评价患者的Karnofsky评分。

1.7.5 不良反应 观察患者回输扩增的免疫活性细胞时及之后的不良反应,如输注时畏寒、寒战、皮疹等过敏反应和治疗前后肝、肾功能的损害。

1.7.6 生存期 随访5年内患者的生存期。

1.8 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件对实验数据进行统计学处理。计量资料组间比较采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 经免疫细胞治疗后患者食欲、体力改善97%,疼痛减轻95%,睡眠改善91%,体重增加(大于治疗前体重5%)97%。大部分患者随访过程中未发生病毒性感冒。经统计学比较,1年、2年和5年联合组与化疗组Karnofsky积分差异有统计学意义,联合组高于化疗组,结果见表2。

2.2 治疗前后免疫细胞亚群比值和绝对值变化 化疗组治疗后各细胞亚群较治疗前显著降低($P < 0.05$),其绝对值下降尤为明显。联合组治疗后各

细胞亚群多数较治疗前显著升高 ($P < 0.05$), 而绝对值升高的幅度高于亚群比值升高的幅度。2 组治疗后免疫细胞亚群比值和绝对值: 联合组高于化疗组。见表 3。

表 2 联合组和化疗组患者的 Kampsfsky 积分比较 [% (例)]

计分值	联合组 ($n=40$)			化疗组 ($n=43$)		
	生存 1 年	生存 2 年	生存 5 年	生存 1 年*	生存 2 年*	生存 5 年*
100	32.5 (13/40)	10.7 (3/28)	25.0 (1/4)	7.0 (3/43)	10.0 (1/10)	0 (0/2)
80	17.5 (7/40)	7.1 (2/28)	0 (0/4)	4.7 (2/43)	0 (0/10)	0 (0/2)
60	7.5 (3/40)	3.6 (1/28)	25.0 (1/4)	2.2 (1/43)	10.0 (1/10)	0 (0/2)
40	5.0 (2/40)	3.6 (1/28)	25.0 (1/4)	4.7 (2/43)	0 (0/10)	50.0 (1/2)
20	7.5 (3/40)	3.6 (1/28)	25.0 (1/4)	4.7 (2/43)	10.0 (1/10)	50.0 (1/2)

与联合组相同生存时点比较: * $P < 0.05$

表 3 2 组治疗前后免疫细胞亚群比值和绝对值比较

指 标	化疗组 ($n=43$)				联合组 ($n=40$)			
	治疗前		治疗后		治疗前		治疗后	
	T 细胞亚群 (%)	绝对值 ($\times 10^9$)	T 细胞亚群 (%)	绝对值 ($\times 10^9$)	T 细胞亚群 (%)	绝对值 ($\times 10^9$)	T 细胞亚群 (%)	绝对值 ($\times 10^9$)
CD3 (+)	63.73 $\pm$ 8.05	0.94 $\pm$ 0.58	53.85 $\pm$ 5.25 [#]	0.61 $\pm$ 0.37 [#]	67.55 $\pm$ 2.34	1.07 $\pm$ 0.44	74.22 $\pm$ 2.3 ^{*#}	1.45 $\pm$ 0.28 ^{*#}
CD4 (+)	30.34 $\pm$ 8.47	0.45 $\pm$ 0.32	23.31 $\pm$ 6.85 [#]	0.26 $\pm$ 0.22 [#]	32.65 $\pm$ 1.65	0.54 $\pm$ 0.26	35.25 $\pm$ 2.34	0.73 $\pm$ 0.31 ^{*#}
CD8 (+)	31.17 $\pm$ 7.25	0.46 $\pm$ 0.27	20.12 $\pm$ 6.67 [#]	0.18 $\pm$ 0.14 [#]	30.13 $\pm$ 2.3	0.41 $\pm$ 0.19	35.62 $\pm$ 3.50 ^{*#}	0.70 $\pm$ 0.20 ^{*#}
CD19 (+)	9.32 $\pm$ 2.13	0.14 $\pm$ 0.13	6.17 $\pm$ 1.39 [#]	0.05 $\pm$ 0.16 [#]	8.62 $\pm$ 1.18	0.14 $\pm$ 0.17	8.30 $\pm$ 1.12	0.17 $\pm$ 0.15 ^{*#}
CD16 (+)	19.33 $\pm$ 4.01	0.28 $\pm$ 0.29	14.88 $\pm$ 3.25 [#]	0.13 $\pm$ 0.07 [#]	21.13 $\pm$ 2.0	0.26 $\pm$ 0.22	15.81 $\pm$ 1.96 [#]	0.25 $\pm$ 0.19 [*]
CD56 (+)								
CD4/CD8	0.98 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.11	1.16 $\pm$ 1.02	1.44 $\pm$ 0.23	1.30 $\pm$ 0.83	1.32 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.69	1.04 $\pm$ 0.18 ^{*#}
$\gamma\delta$ T 细胞	5.89 $\pm$ 1.47	0.09 $\pm$ 0.04	3.59 $\pm$ 2.78 [#]	0.03 $\pm$ 0.02 [#]	6.18 $\pm$ 1.21	0.08 $\pm$ 0.03	6.88 $\pm$ 1.14 [*]	0.21 $\pm$ 0.14 ^{*#}

与化疗组治疗后相应值比较: * $P < 0.05$; 与同组治疗前相应值比较: [#] $P < 0.05$

2.3 治疗前后 perforin、GranB 及 CD107a 比较 化疗组治疗后 PBMC 的 perforin、GranB 及 CD107a 明显低于治疗前; 联合组治疗后 perforin、GranB 及 CD107a 均高于治疗前, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且治疗后这 3 个指标值均显著高于化疗组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 2 组治疗前后 PBMC 的 perforin、GranB 及 CD107a 表达的比较 (%)

组别		<i>n</i>	perforin	GranB	CD107a
化疗组	治疗前	43	55.6 ± 3.12	30.1 ± 3.25	56.5 ± 2.47
	治疗后	43	50.1 ± 3.17 [#]	28.2 ± 3.74	53.1 ± 3.79
联合组	治疗前	40	54.6 ± 2.19	31.0 ± 3.29	53.9 ± 3.68
	治疗后	40	63.7 ± 3.7 ^{*#}	41.1 ± 4.11 ^{*#}	67.9 ± 4.23 ^{*#}

与化疗组治疗后比较: * $P < 0.05$; 与同组治疗前比较: [#] $P < 0.05$

2.4 生存时间 本组无一例失访。联合组中, 患者 1 年、2 年和 5 年生存率分别为 70.0% (28/40)、20.0% (8/40) 和 10.0% (4/40), 高于化疗组的 23.2% (10/43)、7.0% (3/43) 和 4.6% (2/43); 其中 II 期、III 期患者 1 年、2 年和 5 年生存率以及 IV 期患者 1 年生存率 2 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), IV 期患者 2 年、5 年生存率组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

2.5 不良反应 联合组仅有 2 名患者在免疫细胞回输过程中出现寒战, 体温 37.5 ~ 38.6℃, 对症处理后缓解, 治疗后肝、肾功能检查结果无明显改变。
2.6 CEA 检查 联合组中 28 例 CEA 增高, 经治疗后有 23 (82.1%) 例下降, 3 例 (10.7%) 恢复正常; 化疗组 31 例 CEA 增高, 经治疗后有 8 例 (25.8%) 下降, 无恢复正常病例。

表 5 不同肿瘤分期 CRC 联合治疗组与化疗组的生存期比较[%(例)]

肿瘤分期	联合组(n=40)			化疗组(n=43)		
	1 年生存率	2 年生存率	5 年生存率	1 年生存率	2 年生存率	5 年生存率
Ⅱ	100(14/14)	35.7(5/14)	21.4(3/14)	40.0(6/15) *	13.3(2/15) *	13.3(2/15) *
Ⅲ	76.9(10/13)	23.1(3/13)	7.7(1/13)	20.0(3/15) *	6.7(1/15) *	0(0/15) *
Ⅳ	30.7(4/13)	0(0/13)	0(0/13)	7.7(1/13) *	0(0/13)	0(0/13)
合计	70.0(28/40)	20.0(8/40)	10.0(4/40)	23.2(10/43) *	7.0(3/43) *	4.6(2/43) *

与联合组相应生存率比较: * $P < 0.05$

3 讨 论

一些研究表明,CRC 患者具有适应性免疫和固有免疫细胞数量减少和功能低下现象,尤其是晚期患者这一现象更加明显^[1-3]。此外,晚期 CRC 患者由于肿瘤体积较大,肿瘤微环境内常存在免疫抑制现象,通过化疗,肿瘤细胞容易产生抵抗和免疫逃逸。近 20 年来,随着对 CRC 免疫机制的不断了解,人们对 CRC 进行免疫治疗做了许多研究和临床试治工作,取得了一定的疗效^[4-9]。免疫编辑理论认为,在机体抗肿瘤免疫反应中固有免疫和适应性免疫细胞均参于这一过程。在免疫逃逸期由于肿瘤细胞分泌的许多因子使进入肿瘤内的免疫细胞被“驯化”,从而形成以肿瘤细胞为中心的免疫抑制网络。因此,少量的免疫细胞和单一种类免疫细胞对晚期肿瘤难以取得好的治疗效果,必须采集大量的、功能正常的固有免疫细胞和适应性免疫细胞联合应用才能取得好的临床疗效^[10-13]。

从本组患者的治疗结果来看,化疗联合细胞免疫治疗在患者生存期、免疫细胞的改变和临床疗效等方面均好于单纯化疗。一些化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时也损伤体内免疫细胞,本组化疗后所测得的免疫细胞绝对值均低于化疗前即可证明。虽然化疗能暂时控制肿瘤生长,但由于肿瘤干细胞对化疗不敏感,一段时间后肿瘤仍会继续生长。体内外实验表明,肿瘤干细胞具有免疫原性,一旦能够清除肿瘤干细胞,就能控制肿瘤生长和预防复发^[14-16]。由于一些化疗药物杀伤肿瘤细胞时可以增强肿瘤的免疫原性,此时回输免疫细胞可以增强细胞免疫治疗的效果^[14-18]。因此,化疗如能和细胞免疫治疗有效地结合,将提高治疗效果。

多种免疫细胞联合治疗对患者的免疫细胞数量恢复作用明显,从表 3 可以看出治疗后所测得的免疫细胞绝对值均高于治疗前,更明显高于化疗后。这表明联合治疗除提高细胞免疫功能外,也增加了患者对化疗的耐受力。

本组中使用的 CD3AK 细胞,在体外培养 10 天时其主要细胞群为 CD3(+)CD8(+)T 细胞,这些细胞中有部分可能为肿瘤特异性细胞毒 T 细胞,这在病毒相关性肿瘤患者尤为明显。Karlsson 等^[6]用 16 例进展晚期 CRC 的前哨淋巴制备 CD3AK 细胞进行回输治疗,16 例中 4 例为 CR,1 例为 PR,11 例为 SD。NK 细胞能对不表达 MHC-I、II 类分子的肿瘤细胞和经化疗后产生应激分子的肿瘤细胞进行杀伤^[19-20]。NK T 细胞除通过穿孔素、FasL 等直接杀伤肿瘤细胞外,还通过分泌细胞因子如 INF- γ 来增强适应性免疫细胞和固有免疫细胞的其他细胞的杀伤活性,临床应用研究也取得较好的疗效^[21-22]。 $\gamma\delta$ T 细胞主要识别肿瘤细胞的应激抗原、脂质抗原和磷酸化抗原等,同时对肿瘤干细胞也具有杀伤作用。Bouet-Toussaint 等^[23]报告,自身 $\gamma\delta$ T 细胞能溶解患者原代培养的结直肠癌细胞,对正常结直肠细胞无杀伤作用。 $\gamma\delta$ T 细胞应用于临床已取得了较好的临床效果^[24-27]。Kobayashi 等^[28]报告用自身 $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增后回输治疗一例肾癌肺转移患者取得完全缓解。成熟 DC 通过静脉回输和淋巴结附近注射可以通过分泌细胞因子如 IL-12 来激活初始 T 细胞,荷载结肠癌细胞抗原的 DC 在体内可以诱发适应性免疫^[7]。通过上述各种免疫细胞的联合应用可以杀伤具有不同免疫原性的肿瘤(肿瘤干细胞),和因受各种治疗后而产生的肿瘤逃逸的群丛变型(tumor escape variants),从而能达到清除肿瘤和预防肿瘤复发的作用。

从表 5 可以看出,联合治疗组Ⅱ、Ⅲ期生存期明显高于化疗组,而对Ⅳ期的 CRC 患者不明显。这可能是由于晚期患者有多处转移,肿瘤体积大,回输细胞不能杀伤所有肿瘤细胞;肿瘤负荷太大,形成的微环境内已建立完善的防御机制,进入瘤内免疫细胞受肿瘤释放的免疫抑制作用而不能有效杀伤肿瘤细胞。此外,由于肿瘤内新生血管和淋巴管缺乏相应的黏附分子,血循环中的免疫细胞难以进入瘤内行使杀伤功能^[29]。因此,对于晚期肿瘤必须尽可能进

行免疫细胞瘤内注射,并与介入治疗、化放疗等有机地结合起来才能提高治疗效果。

由于细胞培养技术的发展和卫生行政部门的有效监管,免疫细胞联合治疗 CRC 将成为一种安全有效的治疗方法。

参考文献:

- [1] Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1065-1073.
- [2] Grimm M, Gasser M, Bueter M, et al. Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases [J/OL]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 82.
- [3] Evans C, Dalglish AG, Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 24(8): 1163-1177.
- [4] Boghossian S, Robinson S, Von Delwig A, et al. Immunotherapy for treating metastatic colorectal cancer [J]. *Surg Oncol*, 2011 Feb 1 [Epub ahead of print].
- [5] Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 3064-3069.
- [6] Karlsson M, Marits P, Dahl K, et al. Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(7): 1747-1757.
- [7] Chen W, Rains N, Young D, et al. Dendritic cell-based cancer immunotherapy: potential for treatment of colorectal cancer? [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(7): 698-705.
- [8] Osada T, Hsu D, Hammond S, et al. Metastatic colorectal cancer cells from patients previously treated with chemotherapy are sensitive to T-cell killing mediated by CEA/CD3-bispecific T-cell-engaging BiTE antibody [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(1): 124-133.
- [9] Burgdorf SK, Nielsen HJ, Rosenberg J. Immunotherapy in colorectal cancer [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(3): 261-268.
- [10] Kuppen PJ, Gorter A, Hagenaars M, et al. Role of NK cells in adoptive immunotherapy of metastatic colorectal cancer in a syngeneic rat model [J]. *Immunol Rev*, 2001, 184: 236-243.
- [11] Bhatia A, Kumar Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered [J]. *Cancer Microenviron*, 2011, 4(2): 209-217.
- [12] 陈复兴,李玺,刘军权,等. 肿瘤免疫编辑与免疫治疗[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版, 2007, 28(4): 59-61.
- [13] 陈复兴,李玺,刘军权,等. 论肿瘤免疫的复杂性[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版, 2008, 29(10): 43-46.
- [14] 蔡凯,陈复兴,张南征. 化疗增强肿瘤免疫原性的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(3): 310-314.
- [15] Liu WM, Fowler DW, Smith P, et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(1): 115-123.
- [16] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin [J]. *Oncogene*, 2010, 29(4): 482-491.
- [17] Frazier JL, Han JE, Lim M, et al. Immunotherapy combined with chemotherapy in the treatment of tumors [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2010, 21(1): 187-794.
- [18] Ramakrishnan R, Gabrilovich DI. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(3): 419-423.
- [19] Castriconi R, Daga A, Dondero A, et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties [J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3530-2539.
- [20] Pietra G, Manzini C, Vitale M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7): 793-801.
- [21] Motohashi S, Nakayama T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(4): 638-645.
- [22] Dhodapkar MV. Harnessing human CD1d restricted T cells for tumor immunity: progress and challenges [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 796-807.
- [23] Bouet-Toussaint F, Cabillie F, Toutirais O, et al. Vγ9Vδ2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(4): 531-539.
- [24] Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase-I study of Innacell γδTTM, an autologous cell-therapy product highly enriched in γδ2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(11): 1599-1609.
- [25] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(4): 469-476.
- [26] Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2009, 182(11): 7287-7296.
- [27] 刘军权,陈复兴,巩新建,等. 自身 γδT 细胞联合阿司匹林治疗晚期胃癌的实验研究和临床疗效观察[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(12): 32-36.
- [28] Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, et al. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(2): 575-579.
- [29] Box C, Rogers SJ, Mendiola M, et al. Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3): 128-138.

收稿日期:2011-07-14 修回日期:2011-09-12

本文编辑:孙立杰