

DCIK 细胞用于肺癌临床免疫治疗

朱 柠 陈小东 刘祥麟¹ 张尚权^{*2}(复旦大学附属华山医院呼吸科, 上海200040; ¹中科英达生物技术有限公司, 上海201318; ²中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所, 上海200031)

摘要 观察细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK细胞)和同源树突状细胞(DC)共培养后, 共培养细胞树突状细胞调节的细胞因子诱导的杀伤细胞(DCIK细胞)体外细胞毒活性, 并观察DCIK细胞治疗肺癌的近期临床疗效、免疫学活性及副反应。收录 12 例确诊肺癌经标准治疗方案治疗的患者, 取外周血分离单个核细胞(PBMC), 体外诱导出DC和CIK细胞共培养后, 观察DCIK细胞表型, 用MTT法测体外细胞毒活性; 当效靶比为 20 : 1、10 : 1时, DCIK 细胞体外细胞毒活性杀伤率分别为 55%、46.2%。所有患者均接受一定剂量的DCIK细胞过继免疫治疗, 观察其近期临床疗效、免疫反应、不良反应。12 例患者中完全缓解 1 例, 部分缓解 4 例, 病情稳定 1 例, 近期有效率为 41.6%, 疾病控制率为 50%, 病情进展共 6 例, 其中死亡 2 例。与 DCIK 细胞回输前相比, 患者 CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺ 均有明显的升高($P < 0.05$), 这表示可以诱导患者产生特异性的免疫反应。除两例患者出现一过性的发热外, 其余患者基本无不良反应。DCIK细胞在肺癌免疫治疗中能诱导机体产生特异性的免疫反应, 亦是新的杀伤肿瘤细胞的效应细胞, 有较好的临床疗效。

关键词 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 肺癌; 过继免疫治疗; 临床疗效

肺癌是世界各国最常见的恶性肿瘤。近 20 年的追踪发现, 每年的肺癌的新病例以约 0.5% 的速率增长, 约 80% 的患者到医院就诊时已经失去了外科手术和多学科综合治疗的最佳时机, 经过几十年的努力, 肺癌患者的 5 年生存率仍不到 15%, 目前已成为严重危害人民生命和健康的常见病。长期的临床实践和临床研究已证明, 在规范化治疗的框架内进行肺癌综合治疗, 并不能产生肺癌治疗上的革命性突破。因此, 继续探讨新的肺癌治疗方案, 才能遏制肺癌发病率的不断上升。

随着细胞免疫学和分子生物学的发展, 体内回输免疫活性细胞的过继免疫治疗已成为肿瘤治疗研究中一个新的热点。树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK细胞)共培养, 诱导成树突状细胞调节的细胞因子诱导的杀伤细胞(DCIK细胞)直接杀伤肿瘤细胞, 且兼具 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性与 NK 细胞的非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀瘤特点^[1]。在动物实验中已经证实DCIK细胞回输体内的过继免疫治疗具有较强的广谱的抗肿瘤活性, 显示出在肿瘤免疫治疗中巨大的应用价值^[2, 3]。本试验是通过将 DC 与 CIK 细胞共培养后观察 DCIK 细胞体外杀伤肿瘤细胞活性, 进一步将其回输患者体内观察其近期临床治疗

肺癌疗效、免疫学活性及不良反应。

1 材料与方法

1.1 研究对象

12 例临床和病理确诊为肺癌的患者, 其中男性 8 例, 年龄为 48~75 岁, 平均年龄为 60.6 岁; 女性 4 例, 年龄为 42~66 岁, 平均年龄为 57 岁。

入组标准: 组织学或细胞学确诊为晚期的肺癌患者; 接受过肺癌的规范化治疗包括手术、化疗或放疗; 末次治疗至开始接受 DCIK 治疗的间隔时间为 4 周; 年龄 ≥ 18 岁; PS 评分 ≤ 80 分。本研究获本单位伦理学委员会的批准, 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。

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; 怀孕期或哺乳期妇女; 存在违反本试验的体检或实验室异常者。

1.2 主要试剂来源

AIM-V 来源于 Gibco 公司, IFN- γ 为上海生物制品研究所提供, rh-IL-2 由上海华新生物技术公司提

收稿日期: 2007-07-02 接受日期: 2007-11-15

上海市科委重大科技攻关计划资助项目(No. 05D219311)

*通讯作者: Tel: 021-54921431, E-mail: quansz123@hotmail.com

供, rh-IL-4由Amoytop Biotech提供, rh-GM-CSF由上海东昕生物技术有限公司提供, TNF- α 由上海塞达生物药业有限公司提供, rh-IL-1- β 由晶美生物工程有限公司提供, α CD3由Yes公司提供, 淋巴分离液由PAA公司提供, 白蛋白由上海生物制品研究所提供, A549人肺腺癌细胞株由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供。

1.3 外周血单核细胞(PBMC)的分离

取12例确诊肺癌晚期患者外周血及手术采集淋巴结分离出PBMC, 参照张嵩等^[3]、Whiteside等^[4]方法进行诱导培养和扩增。

1.4 DC和CIK细胞的体外培养

取PBMC接种到AMI-V培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 添加1 000 U/ml IFN- γ , 在37℃、5% CO₂条件下培养2 h, 将非黏附细胞移入经抗CD3单抗包被的100 ml培养瓶中, 添加rh-IL-1- β 、rh-IL-2, 使两者中浓度分别为: 100 U/ml, 300 U/ml, 继续培养48 h后, 用DCIK细胞培养液稀释至 5×10^5 个/ml继续培养, 每两天计数一次并稀释至 5×10^5 个/ml再次培养。在留有黏附细胞的培养瓶中, 加入DC培养液(20 ml/瓶), 37℃、5% CO₂条件下培养5天, 并加入TNF- α 使其终浓度为200 U/ml继续培养7天, 电镜观察其细胞形态。

1.5 体外诱导的DCIK细胞

将分别诱导培养7天的DC与CIK细胞1:5混合后, 按 5×10^5 个/ml浓度再隔天传代培养10~14天, 收集DCIK细胞加入2 g人体血清白蛋白, 置入0.9%氯化钠200 ml注射液中备用。

1.6 DC、DCIK细胞形态测定

取DC培养液0.5 ml, 细胞密度为 1×10^5 个/ml, PBS洗涤2次, 重悬细胞, 加样于多聚赖氨酸包被玻片, 室温下静置10 min, 用3%戊二醛4℃固定2 h; 用1%锇酸4℃固定1 h; 梯度酒精脱水、临界干燥法干燥后镀膜, 电镜下观察。

1.7 细胞表型分析

原理为应用FITC标记抗人CD单抗与DCIK细胞表面CD结合, 测试肺癌患者免疫治疗前后, 血相白细胞表型及体外诱导培养的回输给患者的DCIK细胞CD3⁺CD56⁺的百分率(表1)。取一定体积的细胞(细胞总数为 1×10^6 个/ml)悬液于流式细胞仪测试管中, 离心, 弃上清液, 保留细胞。按照美国Becton Dickinson公司的标记抗体使用说明, 将抗人的CD3-FITC、抗CD56-PE、抗CD4-FITC、抗CD8-FITC

加入测试管中, 混匀, 4℃30 min, 后离心1 000 r/min 3 min, 用PBS洗涤细胞3次, 后悬浮于0.5 ml PBS中, 流式细胞仪测试。

1.8 DCIK细胞体外杀伤活性分析

取培养13天的DCIK细胞作为效应细胞, 靶细胞为A549人肺腺癌细胞, 按效靶比20:1、10:1、5:1、2.5:1比例加入96孔培养板中, 另设单独靶细胞组和单独效应细胞组作为对照, 在37℃、5% CO₂培养过夜, 采用MTT法测定波长为570 nm处吸光度。

$$\text{杀伤率} = [1 - (ET - E) / (T - C)] \times 100\%$$

E为效应细胞DCIK, ET为效应细胞作用于靶细胞, T为靶细胞A549, T为对照, C为空白。

1.9 免疫治疗计划

每位患者在接受其他标准治疗后4周, 在完善治疗前基线评估后, 静脉回输DCIK细胞, 每次近似于 1×10^9 个, 总体200 ml, 每次间隔1月, 每3次为一疗程。本课题肺癌患者共计使用3个疗程, 在完成上述规定治疗后, 所有患者在接受治疗后即开始进入随访期。

1.10 疗效评价与观察指标

主要终点评价指标为无肿瘤进展时间, 次要终点评价指标为近期疗效和不良事件。

无肿瘤进展时间定义为: 接受免疫治疗起到肿瘤进展时间。

临床疗效评价: 若有可评价病灶的患者的临床疗效评定, 按照卫生部1988年颁布的实体瘤客观疗效评定标准进行。完全缓解(CR): 瘤体完全消失持续至少4周以上; 部分缓解(PR): 肿瘤最大直径减少50%以上, 持续至少4周; 病情稳定(SD): 肿瘤增大或缩小均不超过25%, 无新病灶; 病情进展(PD): 肿瘤增长大于25%或出现新的病灶。完全缓解+部分缓解为近期有效率, 完全缓解+部分缓解+病情稳定为疾病控制率。若无可评价病灶的患者影像学检查发现疾病复发或转移则为病情进展(PD)。接受治疗后第4周、第8周评价近期临床疗效, 复查胸部CT、评估临床症状, 血常规、血生化常规等; 如怀疑有肿瘤转移, 加做相关检查。

免疫学评价: 接受治疗后2周末, 评价12例患者治疗前后外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺的变化。

不良事件: 依据美国国立癌症研究所制定的通用药物毒性反应标准, 将各种不良事件分为0~Ⅳ度,

度+ 度+ 度+ 度为毒性反应发生率。

随访: 所有患者在疗效评价之后每3个月随访1次, 行相关检查。如怀疑有肿瘤转移, 加做相关检查。病情进展的患者接受其他肺癌的治疗方案, 仍然接受随访。截止时间为2007年5月31日。

1.11 统计学处理

数据采用均数±标准差的方式表示, 采用t检验, 所有统计学处理均采用统计软件SPSS 15.0完成。

2 结果

2.1 细胞形态

DC制备标本在电镜下观察细胞表面呈绒毛状突起, 且随诱导培养时间的延长, 其突出的绒毛更为明显(图1)。用相差显微镜直接观察培养的DCIK细胞, 细胞形态规则透亮(图2)。

2.2 DCIK 细胞体外杀伤 A549 肺腺癌细胞活性分析

本试验采用人体肺腺癌细胞 A549 作为靶细胞, 检测诱导培养 13 天的 DCIK 细胞对人体肺腺癌细胞 A549 杀伤率: 效靶比不同时, DCIK 细胞的细胞毒活性强度不同, 当效靶比为 2.5 : 1、5 : 1、10 : 1、20 : 1 时, DCIK 细胞杀伤率分别为 20.1%、29.5%、46.2%、55%。DCIK 细胞对 A549 的杀伤活性随着效靶比的增加而增强(图3)。

2.3 临床疗效评价

12例患者随访时间为5~24个月, 中期随访时间为16个月。近期疗效评价中, 完全缓解1例, 部分缓解4例, 病情稳定1例, 近期有效率为41.6%, 疾病控制率为50%, 无肿瘤进展时间为11~20个月, 中位无肿瘤进展时间为17个月。其中近期评价有效的患者临床主观症状改善明显, 如: 疼痛症状减轻至可以耐受, 咳嗽症状减轻, 声音嘶哑改善等。病情进展共6例, 为远处转移或者为肺内转移, 其中死亡2例, 死亡原因为多器官功能衰竭(表1)。

2.4 免疫学疗效评价

治疗结束后2周末, 所有患者CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺均较治疗之前有明显升高($P < 0.05$), CD3⁺未见明显升高; 在DCIK细胞治疗之前, CD3⁺平均百分率为77.70%, 治疗之后平均百分率为77.66%, $t = 0.019$, $P > 0.05$; 在DCIK细胞治疗之前, CD4⁺平均百分率为24.63%, 治疗之后平均百分率为35.78%, $t = 8.33$, $P < 0.05$; 在DCIK细胞治疗之前, CD8⁺中位百分率为32.10%, 治疗之后中位百分率为41.05%, $t = 7.38$, $P <$

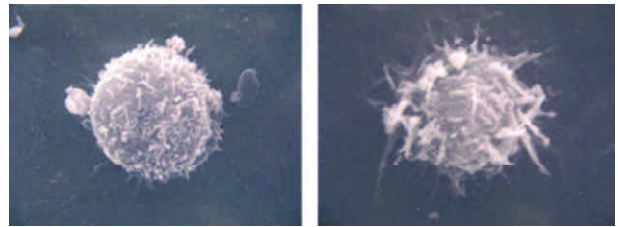


图1 DC 在电子显微镜下细胞形态
左图为培养早期的DC, 右图为培养成熟的DC。

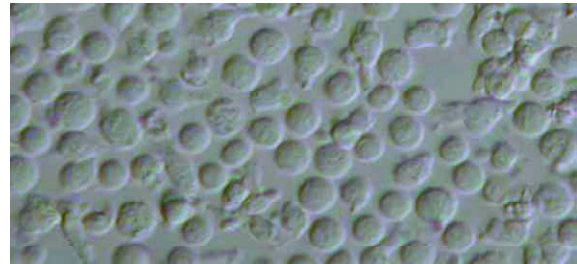


图2 DCIK 细胞在相差显微镜下所示细胞形态

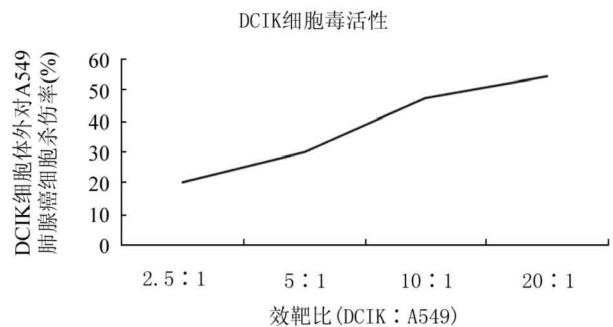


图3 诱导培养13天的DCIK细胞对人体肺腺癌细胞A549杀伤率分析

0.05; 在DCIK细胞治疗之前, CD56⁺平均百分率为11.46%, 治疗之后平均百分率为25.96%, $t = 30.05$, $P < 0.05$ 。提示该疗法可使CD3⁺CD56⁺双阳性细胞明显升高, 增强了杀伤肿瘤细胞活性; 并且提高了患者体内的CD4⁺、CD8⁺基础水平, 可诱导患者产生特异性的抗肿瘤免疫反应(图4)。

2.5 不良事件分析

在接受DCIK细胞过继免疫治疗的12例患者中, 依据美国国立癌症研究所制定的通用药物毒性反应标准, 并未出现度+度的严重不良反应。有2例患者出现一过性的发热症状。

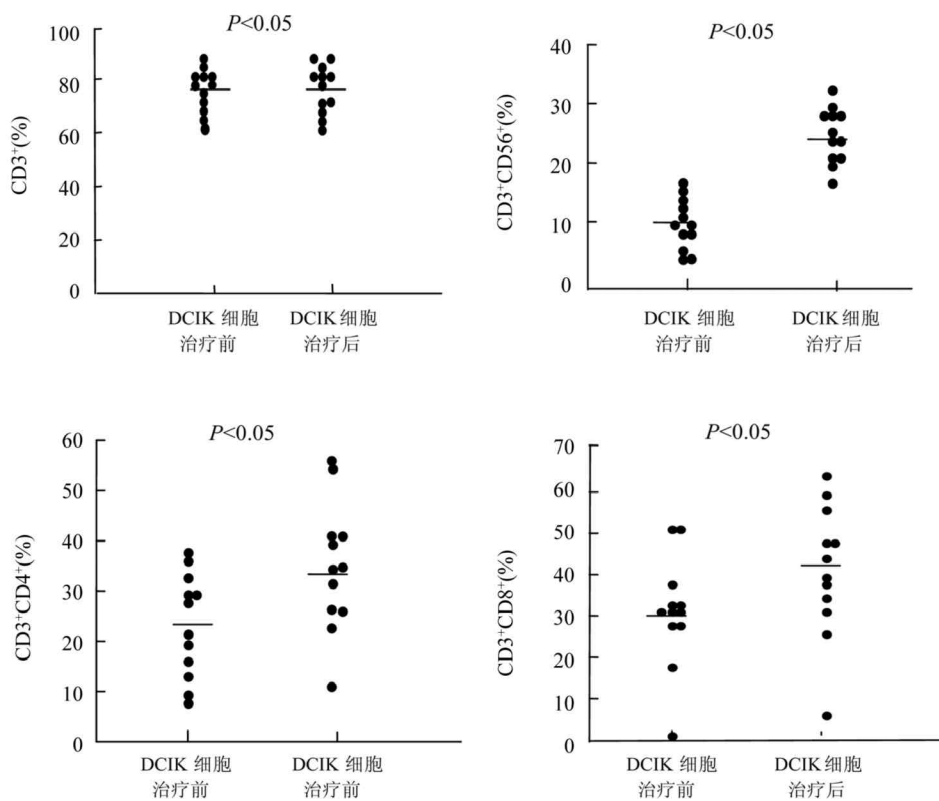
3 讨论

DC是到目前为止发现的人体最有效的抗原提呈

表1 患者一般情况及DCIK 细胞临床疗效

病例	性别	年龄	吸烟	肺癌病理类型	临床分期	转移部位	既往治疗方案	KPS 评分	回输DCIK CD3 ⁺ CD56 ⁺ 百分比	近期临床疗效	无肿瘤进展生存时间(月)
1	男	73	有	腺癌		骨、脑	手术+放疗+化疗	90	49.7%	PR	11
2	男	48	有	鳞癌	b		手术+化疗+放疗	80	47.9%	SD	12
3	男	75	有	鳞癌		脑	化疗	80	48.9%	PD	
4	男	56	有	鳞癌	b		手术+化疗	90	46.1%	PR	16
5	男	63	有	低分化		脑	放疗+化疗	80	47.8%	PD	
6	男	53	有	鳞癌	b		手术+化疗	90	50.0%	PR	19
7	男	56	有	鳞癌		脑、骨	化疗+放疗	80	43.8%	PD	
8	男	61	无	腺癌		肺、脑	化疗+放疗	80	51.2%	PD	
9	女	63	无	腺癌		肺	手术+化疗	90	49.3%	PR	24
10	女	66	无	低分化癌		脑、肺	化疗	80	42.7%	PD	
11	女	57	无	腺癌	b		手术+化疗	90	49.1%	PD	
12	女	42	无	腺癌	b		手术+化疗	90	53.5%	CR	20

上述所有患者均接受DCIK 治疗三个疗程后评价近期疗效; CIK 细胞群中具有更强的杀伤活性的细胞为CD3⁺CD56⁺ 双阳性NKT 细胞, 它是主要的抗肿瘤活性细胞; CR: 完全缓解; PR: 部分缓解; SD: 病情稳定; PD: 病情进展; KPS: Karnofsky评分标准。

图4 DCIK 细胞治疗2周末, 比较外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺的变化

细胞(APC)之一。APC与T细胞之间的相互作用所诱发的免疫应答是免疫抑瘤效应的中心环节。DC在大多数组织体内以未成熟状态存在,不能直接刺激T细胞,但具有特殊的捕获和加工抗原的能力。肿瘤细胞表面缺乏MHC和共刺激分子,无法激活T细胞免疫,这是肿瘤免疫逃逸的重要机制^[5]。体内外实

验研究均表明DC能诱导肿瘤宿主对特异性抗原的免疫应答,提高肿瘤宿主免疫效应细胞的细胞毒活性^[6,7]。体外大量诱导产生的DC用肿瘤标志物蛋白进行免疫刺激制备的疫苗在国外已经进入3期临床试验^[8]。

目前已有大量研究证实CIK细胞比淋巴因子活

化的杀伤细胞(LAK细胞)具有以下优势:增殖活性强,抗肿瘤杀伤活性强,CIK细胞群中主要的效应细胞兼具T细胞和NK细胞的表型,CIK细胞体内产生活性不需要IL-2同时大量输入,从而避免IL-2的严重副反应^[9]。Schmidt-Wolf等^[10]提出了CIK细胞的经典诱导方案,并在人B型淋巴瘤SCID鼠动物模型中,实验证明CIK细胞比LAK细胞具有更强的杀伤肿瘤细胞活性,主要归因于CIK细胞群中CD3⁺CD56⁺双阳性细胞。CurieI等^[11]研究发现在卵巢肿瘤中发现大量具有免疫抑制作用的CD4⁺CD25⁺T调节细胞(Treg)浸润,这表明患者体内抗肿瘤免疫被抑制,而CIK细胞还可分泌IL-10抑制Treg细胞,发挥抗肿瘤作用。

CIK细胞杀伤靶细胞的机制尚未完全阐明:CIK细胞表面不表达CD16(Fc受体),因此它不是通过抗体依赖的细胞毒性杀伤靶细胞,而是通过释放穿孔素导致靶细胞脱颗粒溶解^[12]。CIK细胞的细胞毒效应可以被黏附因子LFA-1和ICAM-1的自身抗体所阻断^[13]。

大量研究表明,DC与CIK细胞共培养后产生的DCIK细胞群体比同源CIK细胞具有更强的增殖活性和更强的抗肿瘤活性。Marten等^[1]研究发现,DC与CIK细胞共培养,二者相互促进,共同成熟。CIK细胞促进DC表面抗原递呈分子表达增加,分化成熟,高水平分泌IL-12;DC则使CIK细胞表面CD4⁺、CD28⁺、CD40⁺及其配体CD40L表达增加,使CIK细胞增殖、成熟。CIK细胞群中CD3⁺CD56⁺双阳性细胞(NKT细胞)比例增加,提高了CIK细胞的杀伤活性,并且能够分泌更高水平的IL-12。机制可能是通过CD3单抗激活CIK细胞产生第一信号,DC表面CD40、CD80等共刺激因子提供第二信号,共同激发CIK细胞的杀伤活性。细胞之间的相互作用与IL-12分泌明显增加可能是DCIK细胞毒活性增加的重要机制^[2]。

DC与CIK细胞共培养后产生的DCIK细胞群体的功能与用外源肿瘤细胞裂解物、肿瘤相关抗原激活的DC、CIK细胞共培养的细胞不同,前者不受MHC限制,且有较强的肿瘤杀伤免疫活性,还能显著降低肿瘤病人的免疫耐受性、下调Treg细胞的免疫

抑制作用,并可以有效避免患者自身免疫性疾病的产生^[1]。

本试验结果表明DC与CIK细胞共培养后,细胞群中CD3⁺CD56⁺双阳性和CD8⁺细胞含量明显升高。12例确诊为肺癌的患者,在接受其他肺癌标准治疗后复发或转移,符合入选标准,接受DCIK细胞静脉治疗,按照上述免疫治疗方法后,观察其临床疗效,发现近期临床有效率达41.6%,中位无肿瘤进展时间可达17.5个月,患者自我感觉均有不同程度的改善,主要表现为咳嗽减轻,疼痛症状明显缓解。在接受3次免疫治疗后,测其免疫学指标,发现CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺细胞比例均有明显升高,说明在DCIK细胞静脉回输后,能有效诱导机体产生特异性的T细胞免疫。除个别患者出现轻微的发热症状外,未发生严重的不良反应。

从上述临床结果分析,我们可以得出结论,DC和CIK细胞共培养后得到的DCIK细胞,回输肺癌患者体内,能有效诱导机体产生获得性免疫反应,可以使患者获得较好的临床治疗效果,而且几乎没有不良反应。在目前强调肺癌多学科综合治疗的理念下,为使患者获得最佳的治疗效果,在接受手术、化疗、放疗标准治疗后,细胞免疫治疗不失为一种新的辅助治疗手段,而DCIK细胞是目前的最佳选择,具有广阔的临床应用前景。但由于本试验纳入的病例数较少,有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Marten A et al. J Immunother, 2001, 24: 502
- [2] Leemhuis T et al. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11: 181
- [3] 张 嵩等. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27: 315
- [4] Whiteside TL et al. Cancer Immunol Immunother, 1988, 26: 1
- [5] Chang GC et al. Cancer, 2005, 103: 763
- [6] Triozzi PL et al. Cancer, 2000, 89: 2646
- [7] Van den Broeke LT et al. J Immunol, 2003, 171: 5842
- [8] Joyama S et al. Clin Orthop Relat Res, 2006, 453: 318
- [9] Zoll B et al. Cancer Immunol Immunother, 1998, 47: 221
- [10] Schmidt-Wolf IH et al. J Exp Med, 1991, 174: 139
- [11] CurieI TJ et al. Nat Med, 2004, 10: 942
- [12] Schmidt J et al. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53: 1018
- [13] Chan JK et al. Clin Cancer Res, 2006, 12: 1859

The Clinical Research of Cytokine-induced Killer Cells Co-culturing with Autologous Dendritic Cells on the Clinical Immunotherapy for Lung Cancer

Ning Zhu, Xiao-Dong Chen, Xiang-Lin Liu¹, Shang-Quan Zhang^{2*}

(Respiratory Department, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; ¹Shanghai Zhong Ke Biotech Company, Shanghai 201318, China; ²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract It's to investigate the cytotoxicity *in vitro* of cytokine-induced killer (CIK) cells after co-culturing with autologous dendritic cells (DCs), and to observe their clinical antitumour efficacy, immunological activity, and side effects. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 12 patients with lung cancer, who had been treated with standard protocol. DCs and CIK cells were induced *in vitro*, then we determined the phenotype of cytokine-induced killer cells co-culturing with autologous dendritic cells (DCIK cells) and the cytotoxicity through MTT assay; when the ratios were 20 : 1, 10 : 1, the lysis ratios of DCIK cells were relatively 55%, 46.2%. All the patients were treated with a certain dosage of DCIK cells for immunotherapy, and we evaluated their clinical antitumour efficacy, immunological activity and side effects. Among the 12 patients, 1 patient got complete response, 4 patients got partial response and 1 patient got stable disease, so the recent clinical efficacy rate is 41.6%, and the rate of disease control is 50%. The other 6 patients got disease progressed, including that 2 patients died. The ratios of CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺ significantly increased ($P < 0.05$), comparing with ratios before DCIK cells infusion, which showed it could induce specific immunoreaction. No patient got side effect other than 2 patients who took a brief sensation of heat. DCIK cells is a new kind of killer cells, which could induce specific immunoreaction, and it could get better clinical efficacy.

Key words dendritic cells; cytokine-induced killer cells; lung cancer; immunotherapy; clinical efficacy

Received: July 2, 2007 Accepted: November 15, 2007

This work was supported by the Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No.05D219311)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921431, E-mail: quansz123@hotmail.com