结直肠癌术后放化疗联合 DC-CIK 的疗效分析

应敏刚　魏植强　杨建伟　陈路川　郑秋红

【摘要】 **目的**　探讨放化疗联合树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)对结直肠癌的疗效。**方法**　回顾性分析 51 例结直肠癌根治术后行放化疗联合 HPS70(Heat Shock Protain70)负载的 DC-CIK 细胞疗法患者的临床资料,采用 1∶1 配对的方法,以性别、年龄、部位、病理分期、AJCC(1997)中临床分期、术后辅助化疗方案、是否接受术后辅助放疗为指标,在同期行结直肠癌根治术但未行 DC-CIK 细胞疗法的患者中选择 51 例作为对照,比较两组患者 3 年生存率(OS)和 3 年无病生存率(DFS)。**结果**　DC-CIK 治疗组及对照组 3 年生存率分别为 88.2% 和 68.6%,两者比较差异具有显著性($P<0.05$)。DC-CIK 治疗组及对照组 3 年无病生存率分别为 43.1% 和 27.5%,两者比较差异具有显著性($P<0.05$)。**结论**　结直肠癌根治术后放化疗联合 DC-CIK 细胞疗法,能明显提高患者的远期生存率和无病生存率。

【关键词】 结直肠癌;热休克蛋白; DC-CIK 细胞 ;无病生存率

中图分类号:R735.3+5　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-5930(2010)03-0274-03

Retrospective Analysis of Pos - operative Chemo - radiotherapy Combined with DC - CIK in the Treatment of Patients with Colorectal Cancer

YING Min-gang, WEI Zhi-qiang, YANG Jian-wei, et al.　*The Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fujian Province Tumor Hospital, Fuzhou*, 350004

【**Abstract**】 **Objective**　To evaluate the effect of chemotherapy and radiotherapy combined with DC - CIK in the treatment of colorectal cancer after radical resection. **Methods**　The clinical data were retrospectively reviewed of 51 patients treated by adjuvant chemotherapy and radiotherapy combined with DC - CIK loaded with heat shock protain 70(HSP70) after radical resection. A cohort of 51 patients with colorectal cancer treated by adjuvant chemotherapy and radiotherapy only were chosen in respect of gender, age, location of the tumor, histologic type, the AJCC(1997)'s stage, adjuvant chemotherapy programs, whether or not receiving adjuvant radiotherapy. **Results**　The 3 - year survival rate in the DC - CIK treatment group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The 3 - year disease - free survival rate in the DC - CIK treatment group is significantly higher than that in the control group($P<0.05$). **Conclusion**　chemotherapy and radiotherapy combined with DC - CIK could improve the disease - free survival and the overall survival of patients with colorectal cancer.

【**Key words**】 Colorectal cancer; Heat shock protain; DC-CIK cells; The disease-free survival rates

(*The Practical Journal of Cancer*, 2010, 25: 274 ~ 276)

我院从 2000 年 12 月至今在结直肠癌根治术后放化疗的基础上,加以热休克蛋白负载的树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)疗法,明显降低了复发率,提高了远期生存率,现总结报告如下。

1　资料与方法

1.1　研究对象

所选病例为 2000 年 12 月至 2006 年 10 月的住院患者共 102 例,均经病理学、组织学、细胞学等检查确诊为结直肠癌,均行结直肠癌根治术,术后病理检查证实为 R0 切除。102 例患者均为 AJCC(1997)TMN 分期的Ⅰ ~ Ⅲ期患者,对Ⅰ期患者,术后不行放化疗。Ⅱ ~ Ⅲ期患者术后辅助化疗。DC-CIK 治疗组 51 例,男性 31 例,女性 20 例,年龄 28 ~ 86 岁,中位年龄 59 岁,Ⅰ期 6 例,ⅡA 期 3 例,ⅡB 期 12 例,Ⅲ期 30 例,术后辅助化疗采用 FOLFOX 方案 33 例,采用 XELOX 方案 7 例,采用 CF + 5-Fu 方案 3 例,采用希罗达方案 2 例。接受术后辅助放疗 7 例。对照组 51 例,男性 25 例,女性 26 例,年龄 20 ~ 78 岁,中位年龄 54 岁,其中Ⅰ期 6 例,ⅡA 期 3 例,ⅡB 期 12 例,Ⅲ期 30 例,术后采用 FOLFOX 方案化疗 35 例,采用 XELOX 方案 3 例,采用 CF + 5-Fu 方案 5 例,采用希罗达方案 2 例,接受术后辅助放疗 9 例。两组患者卡氏评分均≥80 分,肝、肾功能正常,外周血 WBC≥4.0 $\times 10^9$/L, PLT≥100 ×

基金项目:福建省科技计划重点资助项目 (2007Y0014)

作者单位:350004 福建医科大学附属教学医院福建省肿瘤医院

10^9/L, Hb≥80 g/L, 无严重的内科疾病。

1.2 主要试剂

Ficoll 淋巴分离液(北京军事医学科学院);rhIL-4(英国 Pepro Tech 公司);TNF-α(上海赛达生物药业有限公司);CD3McAb(武汉生物制品研究所);IFN-r(上海克隆公司);rhIL-2(北京瑞德合通药业有限公司);GM-CSF(北京联合药业有限公司);RPMI1640、无血清培养基 AIM-V(美国 Gibco 公司)。

1.3 HSP70 多肽复合物的制备

来源于患者自身肿瘤组织或肿瘤细胞系经玻璃匀浆或超声波粉碎后,21 000 g/ min,离心 60 min,取上清,参照文献[1]方法,分离纯化 HSP70 多肽复合物作为肿瘤抗原,用于负载 DC。

1.4 方法

参照文献[2,3]方法新鲜分离的患者抗凝外周全血 50 ml,经淋巴分离液梯度离心,取界面层单个核细胞,用 RPMI1640 培养液悬浮细胞,离心洗涤细胞 3 次后,收集非贴壁细胞,调整细胞密度约为 1×10^6 个/ml,加入 γ-干扰素 1 000 U/ml,24 h 后加入 rhIL-2 300 U/ml,CD3McAb 70 ng/ml,IL-110 U/ml,每 3 天换液 1 次,同时补加 rhIL-2 100 U/ml。在上述获得的贴壁细胞中加入含 GM-CSF 1 000 U/ml 和 rhIL-41 000 U/ml 的 AIM-V 培养基,每 3 天换液 1 次。第 3 天将按 5 ng/ml 将 HSP70 多肽复合物加入 DC 培养液内,第 5 天加入 TNF-α 1 000 U/ml,第 7 天将负载后的 DC 按 1∶5 的比例加入 CIK 培养液中,共培养 5~7 天。培养 10 天后制成细胞悬液用输血器回输,隔天回输 1 次,将 DC、CIK 2 种细胞体外混合后全身输注。剂量:DC-CIK 回输 100 ml/瓶,细胞数≥10^8 个/ml,连续 8 次为 1 个疗程。治疗组患者最少行 1 个疗程的 DC-CIK 治疗,最多行 6 个疗程的 DC-CIK 治疗,平均行 4 个疗程的 DC-CIK 治疗,给药时间一般在术后或化疗结束后 15 天开始。

1.5 化疗及放疗方案

所有Ⅱ~Ⅲ期患者行术后辅助化疗,采用 FOLFOX、XELOX、CF+5Fu 或希罗达方案化疗 4~10 个周期。术后对Ⅱ~Ⅲ期部分直肠癌患者辅助放疗,术后 4~6 个周开始放疗,照射剂量为每周第 1~5 天,每天 2 Gy,共 5 周,总照射剂量为 50 Gy。结肠癌患者未辅助放疗。

1.6 疗效评价

以复发时间和生存期作为观察指标,观察时间为患者手术时间到 2009 年 10 月 1 日。

1.7 统计学方法

采用 SPSS15.0 软件包进行生存率、无病生存率计算。应用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Logrank test 检验比较两组生存率及无病生存率。率检验采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示统计学差异显著。

2 结果

2.1 DC-CIK 治疗组与对照组临床资料对比结果

两组从性别、年龄、病理分期、AJCC(1997)中临床分期、术后辅助化疗方案、肿瘤部位和是否接受术后辅助放疗等方面进行比较,经卡方检验,结果显示两组资料无统计学差异,具有可比性($P>0.05$)(表 1)。

表 1 两组患者的临床资料比较

临床资料	治疗组	对照组	χ^2	P
性别				
男	31	25		
女	20	26	1.425	0.233
年龄(岁)				
≤50	18	18		
51~69	25	27		
≥70	8	6	1.172	0.547
病理类型				
高分化腺癌	5	5		
中分化腺癌	36	36		
低分化腺癌	4	4		
黏液腺癌	6	6		
TMN 分期				
Ⅰ期	6	6		
Ⅱa 期	3	3		
Ⅱb 期	12	12		
Ⅲ期	30	30		
化疗方案				
FOLFOX	33	35		
XELOX	7	3		
CF+5-Fu	3	5		
希罗达	2	2	2.226	0.544
肿瘤部位				
直肠	27	27		
乙状结肠	11	11		
降结肠	2	2		
横结肠	3	3		
肝曲	2	2		
升结肠	4	4		
盲肠	2	2		
直肠癌行辅助放疗	7	9		
直肠癌未辅助放疗	15	12	0.560	0.454

2.2 生存率

全部病例随访至 2009 年 10 月,随访时间为 13~62 个月,无失访,随访率为 100.0 %。DC-CIK 治疗组

1、2、3 年生存率分别为 100.0%、92.2%、88.2%，对照组 1、2、3 年生存率分别为 100.0%、86.3% 和 68.6%。DC-CIK 治疗组和对照组中位生存期（mOS）分别为 63 个月（95% CI, 55-72）、52 个月（95% CI, 42-62）。Kaplan-Meier 生存曲线和 Logrank test 检验结果表明，治疗组生存期明显长于对照组（$P<0.05$），见图 1。

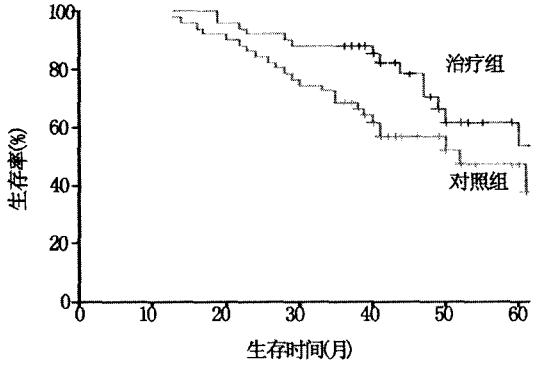

图 1　两组总生存率比较

2.3　无病生存率分析

全部病例随访至 2009 年 10 月，随访时间为 1 ~ 62 个月，无失访，随访率为 100.0 %。DC-CIK 治疗组 1、2、3 年无病生存率（DFS）分别为 80.4%、54.9%、43.1%，对照组 1、2、3 年无病生存率（DFS）分别为 54.9%、33.3% 和 27.5 %。治疗组和对照组中位无病生存时间（mDFS）分别为 34 个月（95% CI, 28-40）、25 个月（95% CI, 19-31）。Kaplan-Meier 生存曲线和 Logrank test 检验结果表明治疗组无病生存率明显高于对照组（$P<0.05$），见图 2。

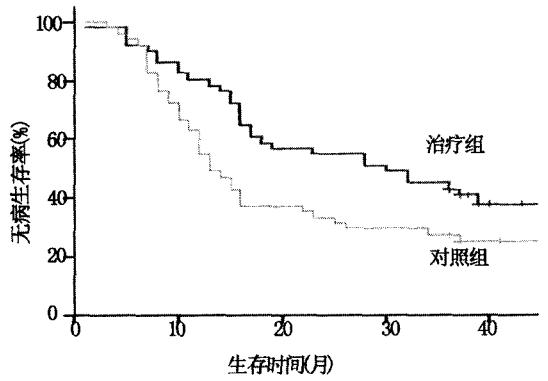

图 2　两组无病生存率比较

3　讨论

DC-CIK 细胞具有增殖快、杀伤活性强等优点，在结直肠癌的治疗中具有广阔应用前景。细胞因子诱导的杀伤细胞 CIK 细胞（cytokine-induced killer cells）是 1 种新型免疫活性细胞，兼有 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和自然杀伤（natural killer cell, NK）细胞的非主要组织相关性复合物限制性杀瘤的特点，杀伤活性可达 84.7%。树突细胞（dendritic cell, DC）是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞，可有效激发 T 细胞应答，有效抵制肿瘤细胞的免疫逃逸机制。但肿瘤抗原肽的分子量均较小，难以直接被 DC 所摄取；即使被 DC 摄取，亦不能有效的促进 DC 成熟并表达各种黏附分子，缺乏激活 T 细胞的第二信号，难以形成有效的免疫应答[4]。HSP 的中文全称是“热休克蛋白”，可与小分子肿瘤抗原肽结合，增强其免疫原性。肿瘤细胞中 HSPs 结合有大量肿瘤细胞特异性抗原，因其携带几乎所有肿瘤抗原，故从肿瘤细胞中获取 HSP70 多肽复合物，既可得到该肿瘤细胞高效、强免疫原性的肿瘤抗原，同时，由于 HSPs 为高度保守蛋白质，同种内不具多态性，可实现对同一肿瘤内的所有瘤细胞特异杀伤，克服了肿瘤免疫治疗中难解决的抗原多变性及细胞异质性的问题。DC 与经纯化的肿瘤 HSP70 多肽复合物结合负载后，可活化机体特异性免疫和非特异性免疫反应，诱导机体产生长寿（long-lasting）的抗肿瘤免疫效应。张嵩等[5]以白血病细胞系 NB4 建立裸鼠模型，结果发现在培养的 15 d，DC-CIK 细胞较 CIK 细胞增殖率明显提高，并可明显抑制肿瘤的成瘤率，予 BAUl/c 裸鼠经尾静脉注射 LoVo 结肠癌细胞建立转移性肺癌模型. 并以 DC-CIK 细胞进行免疫治疗，结果发现 DC-CIK 细胞较 CIK 细胞有更强的杀瘤活性. 可有效抑制血源性肿瘤转移，延长荷瘤鼠的生存时间。张京雨等[6]报道化疗联合 CIK 细胞回输的结直肠癌患者 CD3 +、CD4 +、CD4 +/CD8 +、NK 均显著高于化疗前组，且 CD8 + 显著低于对照组，说明化疗后及时应用 CIK 细胞回输可显著改善结直肠癌的免疫功能，有助于提高机体的抗肿瘤免疫效应。

本研究采用了 HPS70 负载的 DC-CIK，明显提高了肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL），诱导高效的抗肿瘤免疫效应，结果显示 DC-CIK 治疗组 3 年生存率及 3 年无病生存率明显高于对照组，因此结直肠根治术后放化疗联合应用 HPS70 负载的 DC-CIK 是安全有效的，结直肠癌根治术后放化疗联合 DC-CIK 细胞疗法能明显减低复发率，并很有可能对提高结直肠癌患者的远期生存率有帮助。

（下转第 282 页）

EMA 阳性表达率为 0(0/12)。由此可见 Vimentin、AAT、EMA 可做为诊断实性假乳头状瘤的相对特异的免疫组化标记物。从 SPTP 的免疫表型分析,既有外分泌又有内分泌及局灶性上皮的多样性表达,但瘤细胞的组织学形态无明显差异,支持此瘤起源于胰腺多潜能干细胞学说[7]。尽管 NSE、CD56、CD10、Syn、S100、CgA、PR、AE1/AE3 没有特异性,但有必要性。

3.3　鉴别诊断

①无功能性胰岛细胞瘤:此瘤免疫组化 Vimentin 阴性,内分泌激素可有弱表达。②腺泡细胞癌:分化好的腺泡细胞癌需要与本瘤鉴别,前者多发于男性,免疫组化 AE1/AE3 常弥漫强阳性,Vimentin 阴性。③胰母细胞瘤:此瘤多发生于男性儿童,肿瘤由上皮成分和间叶成分构成,在肿瘤中总可找到似胰腺的腺泡、腺样结构,若以腺泡排列的上皮细胞巢为主,常可见鳞状小体[8],无假乳头状瘤结构;免疫组化结果显示胰酶阳性而 Vimentin 阴性。

3.4　治疗与预后

文献报道 60 余例 SPTP 绝大多数术后能被治愈。本组术后随访 4 例 30 ~ 114 个月,无复发,与文献报道的一致[9]。但少数病例生物学行为活跃,侵犯周围组织与器官,提示具有低度恶性,甚至有发生淋巴结、肝、结肠转移的报道[10],所以建议密切随访,加深对此瘤预后的判断。

参考文献

[1] Frantz vk. Tumours of the pancreas in : atlas of tumor patholo-gy [M]. Washington DC: Armed Force Institute of Pathology, 1959 : 32.

[2] Klimstra DS, Wenig BM, Heffes CS. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential[J]. Semin Diagn Pathol, 2000, 17(1): 66.

[3] 孟宇宏,虞积耀. 胰腺实性假乳头状瘤[J]. 诊断病理学杂志,2009,16(5):321.

[4] Pettinato G, Di Vizio D, Manivel Jc, et al. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas : a neoplasm with. Distinct and highly characteristic cy-tological features[J]. Diagn Cytopathol, 2002, 27(6): 325.

[5] Ishikawa O, Ishiguro S, Ohhigashi H, et al. Solid and papillary neoplasm arising from an ectopic pancreas in the mesocolon[J]. Am J Gastroenterol, 1990, 85(5): 597.

[6] 李里香,黄传生,张文昌,等. 胰腺实性假乳头状瘤临床病理分析[J]. 临床与实验病理学杂志,2005,21(5):588.

[7] Balercia G, Zamboni G, Bosina G, et, al, Solid-Cystic tumor of the pancreas an extensive ultrastructural. Study fourteen cases [J]. Jsubmicrosc Cytol Pathol, 1995, 27(3): 331.

[8] 师　杰,钟定荣,崔全才,等. 胰腺实性假乳头状瘤[J]. 诊断病理学杂志,2005,12(5):321.

[9] Jiang J, Gonzalez M, Hartman GG. Pathologic quiz case: a 13-year-old girl with an abdominal mass following trauma. Solid-pseudopapillary carcinoma of the pancreas[J]. Arch Lab Med, 2003, 127(9): 399.

[10] 栾　汛,李　功,宋金筠,等. 胰腺囊实性肿瘤的免疫组化及超微结构观察[J]. 临床与实验病理学杂志,2001,17(5):412.

(收稿日期 2010 - 02 - 24　修回日期 2010 - 03 - 25)

(编辑:吴小红)

(上接第 276 页)

参考文献

[1] 应敏刚,刘　胜,龚福生,等. 快速蛋白液相色谱系统分离与纯化小鼠结肠癌细胞热休克蛋白 70[J]. 中华肿瘤防治杂志,2007,14(18):1386.

[2] 郑秋红,郑天荣,谢云青,等. 树突状细胞对自体 CIK 细胞体外杀伤肺腺癌细胞影响的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2005,12(16):1237.

[3] 郑秋红,郑天荣,卢　林,等. 人外周血树突细胞的分离与提纯[J]. 福建医科大学学报,2000,34(2):115.

[4] Frank O, Nestle, Jacques B. Dendritic cells: on the move from bench to bedside[J]. Nature Medicine, 2001, 7: 761.

[5] 张　嵩,张尚权,白春学. 树突状细胞与同源细胞因子诱导的杀伤细胞共培养细胞在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2004,27(5):315.

[6] 张京雨,张晓明. CIK 细胞过继性免疫治疗对结直肠癌化疗患者免疫指标的影响[J]. 肿瘤学基础与临床,2009,22(1):51.

(收稿日期 2010 - 01 - 01　修回日期 2010 - 04 - 01)

(编辑:吴小红)