

DC-CTL 免疫细胞对 4 种恶性肿瘤治疗疗效观察

蔡学敏, 朱向情, 沈丽蓉, 赵晶, 何洁, 庞荣清, 潘兴华

[摘要] **目的** 初步观察自体 DC-CTL 免疫细胞回输对 4 种恶性肿瘤治疗的临床疗效。**方法** 50 例肿瘤患者分为 4 组, 乳腺癌组 12 例, 肺癌组 27 例, 结直肠癌组 8 例, 卵巢癌组 3 例。分离患者外周血单个核细胞(PBMC), 分别诱导培养细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)、树突状细胞(DC), 诱导培养细胞达足够数量后回输给患者。分别在治疗前后采用流式细胞术检测患者外周血淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和肿瘤标志物的变化, 采用主观问卷调查对卡氏行为能力(KPS)进行评分, 并对治疗疗效进行评价。**结果** 治疗 1 个月后, 总有效率达 82.0%, 且未见明显副作用。治疗后 1 w, 各组外周血 CD3、CD4、CD8 均显著升高($P < 0.05$), 而 CD4⁺/CD8⁺ 无显著变化; 各组外周血 NK、CIK 和 KPS 评分均显著升高($P < 0.05$), 而 CEA、FRP、CA19、CA153 均较治疗前明显下降($P < 0.05$)。**结论** 自体免疫细胞治疗对改善恶性肿瘤患者生活质量, 提高患者的免疫功能有明显作用, 且安全性好, 为恶性肿瘤的治疗提供了一个新的方向。

[关键词] 树突状细胞; 细胞毒 T 细胞; 免疫细胞治疗; 疗效

中图分类号 R 318.1/730.5 **文献标识码** A

文章编号 1004-0188(2016)12-1371-04 **doi**:10.3969/j.issn.1004-0188.2016.12.006

Efficacy of DC-CTL immunological cells on treatment of four malignant tumors

Cai Xuemin, Zhu Xiangqing, Shen Lirong, Zhao Jing, He Jie, Pang Rongqing, Pan Xinghua Cell Biological Therapy Center, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan, 650032, China; National Joint Engineering Laboratory of Stem Cells and Immune Cells and Biological Medicine Technology, Kunming, Yunnan, 650032, China; Key Laboratory of Cell Therapy Technology and Translational Medicine of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, 650032, China; Yunnan Stem Cell Engineering Laboratory, Kunming, Yunnan, 650032, China; Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine of Kunming, Kunming, Yunnan, 650032, China

[Abstract] **Objective** To preliminarily observe the efficacy of autologous DC-CTL immunological cell infusion on the treatment of four malignant tumors. **Methods** A total of 50 tumor patients were divided into four groups: the breast cancer group ($n=12$), the lung cancer group ($n=27$), the colorectal cancer group ($n=8$) and the ovarian cancer group ($n=3$). The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the patients were separated for respective induced culture of CTLs and dendritic cells (DCs). The cells thus cultured were infused to the patients when the number of such cells was adequate. The changes of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ and tumor markers in peripheral blood lymphocyte (PBLs) of the patients were detected by flow cytometry before and after the treatment. Subjective questionnaire was conducted to score the KPS and evaluate the efficacy. **Results** One month after the treatment, the ORR reached 82.0% without any obvious side effects. One week after the treatment, the CD3, CD4 and CD8 in the peripheral blood (PB) in all groups increased significantly ($P < 0.05$), while CD4⁺/CD8⁺ showed no obvious change; the scores of NK, CIK and KPS in the PB in all groups increased greatly ($P < 0.05$), while CEA, FRP, CA19 and CA153 were much lower than those before the treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Autologous immune cell therapy is significantly effective and highly safe on the improvement of the quality of life of tumor patients and their immunologic function, providing a new direction for the treatment of malignant tumors.

[Key words] DC; CTL; immune cell therapy; efficacy

免疫细胞治疗是一种独特的生物治疗技术, 可以利用免疫系统中功能最强的抗原递呈细胞树突状细胞(dendritic cell, DC), 摄取抗原后, 刺激 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞活化, 增加杀伤活性^[1]。我科从 2013 年获原总后卫生部批准开展免疫细胞治疗临

床试验和临床应用, 本研究采用自体 DC-CTL 免疫细胞回输的方法, 对 50 例恶性肿瘤患者进行细胞治疗, 对前期治疗效果进行初步总结。

1 资料与方法

1.1 病例资料 选择本院住院肿瘤患者 50 例, 男 18 例, 女 32 例, 年龄 32~77 岁。按照患者的肿瘤诊断分为 4 组, 其中乳腺癌组 12 例, 肺癌组 27 例, 结直肠癌组 8 例, 卵巢癌组 3 例。多为临床上 II、III 分期患者, 均接受过化疗, 其中乳腺癌组 8 例做过手术, 肺癌组 11 例做过手术, 结直肠癌组 4 例做过手术, 卵巢癌组 1 例做过手术。在接受本治疗前 20 d,

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2014BI01B0); 国家 973 计划项目(2012CB5181060); 云南省科技计划重点项目(2013CA005)

作者单位: 650032 昆明, 成都军区昆明总医院细胞生物治疗中心, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 云南省干细胞工程实验室, 昆明市干细胞与再生医学研究重点实验室

通讯作者: 潘兴华, E-mail: xinghuapan@aliyun.com; 庞荣清, E-mail: pangrq2000@aliyun.com

终止任何放疗或化疗，并测定外周血 T 细胞亚群 (CD3、CD4、CD8)，检测相关肿瘤标志物，进行影像学、血常规等检查。

1.2 治疗方案 参照原总后卫生部“军队医院第三类医疗技术临床应用管理办法”开展自体免疫细胞治疗，每例治疗 3 个疗程，每疗程回输 DC 细胞数为 (1~5)×10⁶ 个细胞，接连 2 d；每次回输细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 数 ≥1×10⁹，每疗程回输细胞总数 >5×10⁹。

1.3 免疫细胞制备方法^[2] 无菌采集患者外周血 80~100 ml，柠檬酸抗凝 30 min。用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞，用无血清培养基重悬细胞，使细胞密度为 2×10⁹ 个/L，加入细胞培养瓶中。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后弃上清，以 37℃ 预温的培养液 RPMI-1640 轻洗去除非贴壁细胞，非贴壁细胞倒入另一培养瓶，用无血清培养基 AIM-V 调整细胞密度为 1×10⁹ 个/L，进行 CTL 细胞的诱导。同时用无菌细胞刮刮取贴壁的黏附细胞，再以无血清培养基 AIM-V 调整细胞密度为 1×10⁹ 个/L。

1.3.1 DC 细胞的体外诱导 (1)向黏附细胞悬液中加入 rhGM-CSF 和 rhIL4，细胞因子的应用浓度均为 50 μg/L，进行 DC 诱导培养；隔天进行半量换液，补充细胞因子，培养 5 d 后加入 TNF-α，浓度均为 50 μg/L，继续培养 2 d。(2)在诱导 DC 的过程中，每天于倒置显微镜下观察细胞形态。(3)7 d 后收集悬浮的细胞，用无菌生理盐水洗涤 3 次，1500 r/min 离心 10 min，去掉上清，细胞悬于 20 ml 生理盐水中，显微镜下计数，细胞数应大于 10⁷。检查无菌、无其他污染后，对患者进行细胞回输治疗，同时可分析 DC 的表型及功能。

1.3.2 CTL 细胞的诱导 (1)向未贴壁细胞悬液中加入 INF-γ，细胞因子的应用浓度为 2000 U/ml，培养 24 h。(2)加入 rhIL-2 浓度为 2000 U/ml，PHA 浓度为 40 μg/ml，CD3 单抗浓度为 100 ng/ml，隔天进行半量换液，补充细胞因子，培养到第 8 d。(3)收集细胞，用无菌生理盐水洗涤 3 次，1500 r/min 离心 10 min，去掉上清，细胞悬于 20 ml 生理盐水中，显微镜下计数，细胞数应大于 10⁹。检查无菌、无其他污染后，对

患者进行细胞回输治疗。

1.4 观察指标 分别在治疗前和治疗后 1 w，采用流式细胞术检测患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺水平和肿瘤标志物，并采用主观问卷调查对卡氏行为能力(KPS)进行评分。

1.5 疗效评定 治疗结束后 1 个月，参照 WHO 实体肿瘤疗效评定标准：完全缓解(CR)：所有可见病变完全消失并至少维持 4 w；部分缓解(PR)：肿瘤基线病灶长径总和缩小 30%；稳定(SD)：肿瘤基线病灶长径总和和有缩小但未达 PR，或有增加但未达 PD；进展(PD)：肿瘤基线病灶长径总和增加 20%或出现新病灶。有效率= [(CR 例数+PR 例数)/总例数]×100%。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件分析，计量资料组间比较采用配对 t 检验，计数资料采用 χ² 检验，P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床治疗效果 治疗总有效率达 82.0% (表 1)，观察期间未见明显毒副作用，仅 2 例输入细胞后出现低热，体温 38℃，2 h 后自行缓解。

2.2 治疗前后各组相关检测指标的变化 治疗后 1 w，各组外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺均显著升高 (P < 0.05)，而 CD4⁺/CD8⁺无显著变化 (P > 0.05)，见表 2。

治疗后 1 w，各治疗组外周血 NK、CIK 和 KPS 评分均显著升高 (P < 0.05，表 3)。

治疗后 1 w，各组 CEA、FRP、CA19、CA153 均较治疗前明显下降 (P < 0.05，表 4)。

3 讨论

肿瘤已经是威胁我国人民生命的主要疾病，全国每年新增肿瘤患者约 220 万，每年约有 180 万人死于肿瘤，占总死亡人数的 1/5，占总死因的第 2 位，在城市占第 1 位^[3]。

DC-CTL 细胞过继免疫治疗就是通过抽取、分离患者外周血中的单个核细胞，在体外添加特异组合的细胞因子及单克隆抗体进行诱导培养，获取大量有抗肿瘤活性 DC 和 CIK 细胞，并可分泌多种有抗肿瘤活性细胞因子，回输到体内后达到直接杀伤体

表 1 各组临床疗效比较 [n (%)]

组别	n	CR	PR	SD	PD	有效
乳腺癌组	12	0(0.0)	10(83.3)	2(16.7)	0(0.0)	10
肺癌组	27	1(3.7)	23(85.2)	3(11.1)	1(3.7)	24
结直肠癌组	8	0(0.0)	7(87.5)	1(12.5)	0(0.0)	7
卵巢癌组	3	0(0.0)	0(0.0)	2(66.7)	0(0.0)	0(0.0)
合计	50	1(2.0)	40(80.0)	8(16.0)	1(2.0)	41(82.0)

表 2 各组治疗前后外周血 T 细胞的变化

组别	CD3 ⁺ (%)		CD4 ⁺ (%)		CD8 ⁺ (%)		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
乳腺癌组	65.2±6.3	71.7±11.3 ^①	33.6±5.7	43.7±5.3 ^①	22.2±6.3	35.2±4.3 ^①	1.40±0.36	1.20±0.33
肺癌组	68.2±8.2	75.3±5.8 ^①	32.7±6.3	45.7±8.5 ^①	23.8±5.3	33.9±8.2 ^①	1.49±0.52	1.32±0.59
结直肠癌组	62.3±9.7	79.8±6.9 ^①	36.2±5.8	44.7±6.6 ^①	22.8±7.7	31.3±6.3 ^①	1.42±0.44	1.30±0.34
卵巢癌组	55.3±12.7	74.9±6.6 ^①	36.7±4.4	38.9±5.6 ^①	14.4±3.7	18.4±3.3 ^①	2.21±0.30	3.10±0.32 ^①

注:与本组治疗前比较,①P<0.05

表 3 各组治疗前后外周血免疫细胞和 KPS 评分变化

组别	n	NK		CIK		KPS	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
乳腺癌组	12	9.5±3.7	16.7±6.2 ^①	4.3±2.7	16.2±4.7 ^①	60.2±16.7	75.2±19.5 ^①
肺癌组	27	8.6±5.1	16.7±4.2 ^①	4.2±2.3	9.9±3.6 ^①	52.8±12.8	83.9±15.4 ^①
结直肠癌组	8	6.5±3.7	17.7±6.0 ^①	4.2±2.2	12.4±3.2 ^①	55.6±11.6	78.4±11.7 ^①
卵巢癌组	3	7.0±2.8	18.4±2.2 ^①	1.7±0.3	4.1±2.2 ^①	63.2±12.7	77.4±16.2 ^①

注:与本组治疗前比较,①P<0.05

表 4 各组治疗前后外周血肿瘤标志物的变化

组别	CEA(ng/ml)		FER(ng/ml)		CA199(U/ml)		CA153(U/ml)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
乳腺癌组	5.2±1.3	1.7±0.3	71.7±16.3	25.2±14.3 ^①	25.2±6.3	15.2±4.7 ^①	27.2±6.3	11.2±6.3 ^①
肺癌组	14.5±4.6	7.5±2.6 ^①	405.0±56.7	156.0±36.2 ^①	37.2±7.9	21.2±6.8 ^①	65.2±6.3	14.3±4.3 ^①
结直肠癌组	8.5±3.6	3.5±1.6 ^①	45.0±15.6	37.0±12.8	14.3±3.9	4.7±2.8 ^①	24.6±8.3	12.3±5.5 ^①
卵巢癌组	4.5±1.7	4.0±1.3	1045.0±45.3	145.0±36.3 ^①	26.3±5.4	11.7±3.9 ^①	653.0±56.0	237.0±47.2 ^①

注:与本组治疗前比较,①P<0.05

内残余肿瘤细胞,预防复发、转移及提高患者机体免疫功能,并可产生免疫记忆保护,达到更长久的抗肿瘤效果^[4]。DC-CTL 细胞治疗肿瘤安全有效,特别是对于手术后的肿瘤患者,对清除残留微小的转移病灶、防止癌细胞的扩散和复发、提高患者自身免疫力等具有重要作用。对于已扩散转移、无法承受手术、放疗、化疗的严重肿瘤患者,也可单独使用免疫疗法或联合使用免疫疗法,可以大大提高患者的承受能力及提高化疗、放疗的疗效,降低放疗、化疗的毒副作用,减轻痛苦,提高患者的生存质量^[5]。

本研究对本院住院 50 例恶性肿瘤患者进行免疫细胞治疗,治疗后,患者的 KPS 评分有显著提高,患者生活质量均有改善,精神状态好转。淋巴细胞免疫功能分析,CD4⁺/CD8⁺细胞比例和数量增加,免疫功能明显改善。从目前的疗效来看,手术、放疗、化疗后的患者,肿瘤负荷较小,相对效果更好。对于肿瘤 IV 期的患者,由于肿瘤负荷较大,自身免疫功能低下,细胞活性不高,相对治疗效果较差,但对生活质量的提高及延长生命有一定作用。因此,免疫细胞治疗应该积极配合其他传统治疗,对肿瘤采取综合治疗的手段,疗效更佳^[6]。

另外免疫细胞治疗相对安全,无毒副作用,仅 2 例输入细胞后出现低热(38℃),2 h 后自行缓解。但目前 DC-CTL 细胞治疗也面临着一些问题,例如如何提高 DC 细胞抗原靶向性;肿瘤细胞免疫逃逸的机制复杂,有时 DC 细胞难以捕获有效抗原;此外 DC 细胞的诱导效率低,也是免疫细胞治疗的瓶颈问题。现在有许多直接转入相关的肿瘤抗原基因到 DC 的方法进行尝试,也有在 DC 细胞中转入 IL-12 的基因^[7],加强抗原提呈的效果,也取得了一定的成效,但仍需进一步的深入研究。

【参考文献】

- [1] Kawakami Y. Cancer treatment by comprehensive regulation of anti-tumor immune network[J]. Nippon Rinsho, 2010, 68(6):1094-1099.
- [2] 蔡学敏,朱向情,刘凌,等. 人外周血树突状细胞的诱导、鉴定及活性测定[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2012, 2(4): 231-236.
- [3] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1): 1-10.
- [4] Wang X, Yu W, Li H, et al. Can the dual-functional capability of CIK cells be used to improve antitumor effects[J]? Cell Immunol, 2014, 287:18-22.

- [5] Pan K, Wang QJ, Liu Q, et al. The phenotype of ex vivo generated cytokine-induced killer cells is associated with overall survival in patients with cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 701-707.
- [6] Chenhong Zheng, Ganjun Yu, Hui Wang, et al. Meta-analysis of chemotherapy and dendritic cells with cytokine-induced killer cells in the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):14527-14537.
- [7] Zhu H, Yang X, Li J, et al. Immune response, safety, and survival and quality of life outcomes for advanced colorectal cancer patients treated with dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 603871-603875.

(收稿日期:2016-07-05)

Notch1 基因沉默抑制骨髓源性脂肪祖细胞向成熟脂肪细胞分化

王金祥,王小华,白盈盈,周芳,蔡学敏,刘菊芬,李自安,余争平,朱光旭,潘兴华

[摘要] **目的** 探讨 Notch1 对骨髓源性脂肪祖细胞(BMAPCs)向脂肪细胞分化的影响。**方法** 无菌取 SD 大鼠股、胫骨骨髓制作细胞悬液,差速贴壁法培养,流式分析检测细胞表面标志表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time qPCR)检测脂肪相关基因和 Notch 信号分子表达。Notch1 基因沉默实验分为空载体组和 Notch1 小 RNA 干扰组。Western blotting 检测干扰效率;STEMPRO[®] Adipogenesis Differentiation Kit 行细胞成脂诱导。**结果** BMAPCs 表达 CD34、CD44、CD45 及 CD90,且表达 6 种脂肪相关基因及 Notch 信号分子;成脂诱导促进 Notch1 mRNA 表达($P < 0.01$);Notch1 小 RNA 干扰抑制 Notch1 蛋白表达($P < 0.05$)。Notch1 小 RNA 干扰组的 Cebpa、Lpl 和 Ppar γ 、Slc2a4 与 Fabp4 mRNA 表达均较对照显著降低,而 pread1 mRNA 表达显著增加($P < 0.05 \sim P < 0.01$);Notch 小 RNA 干扰显著抑制脂肪细胞百分率($P < 0.05$)。**结论** Notch1 基因沉默抑制 BMAPCs 向成熟脂肪细胞分化。

[关键词] 骨髓源性脂肪祖细胞;造血干细胞;间充质干细胞;Notch1

中图分类号 R 318.1 **文献标识码** A

文章编号 1004-0188(2016)12-1374-05 **doi:**10.3969/j.issn.1004-0188.2016.12.007

Inhibition of adipocyte differentiation of BMAPCs to mature fat cells by Notch1 gene silencing

Wang Jinxiang¹, Wang Xiaohua², Bai Yingying¹, Zhou Fang¹, Cai Xuemin¹, Liu Jufen¹, Li Zi'an¹, Yu Zhengping³, Zhu Guangxu¹, Pan Xinghua¹ 1. Cell Biological Therapy Center, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan, 650032, China; National Joint Engineering Laboratory of Stem Cells and Immune Cells and Biological Medicine Technology, Kunming, Yunnan, 650032, China; Key Laboratory of Cell Therapy Technology and Translational Medicine of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, 650032, China; Clinical College of Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, 650032, China; 2. Material Evidence Identification Center of Chongqing Public Security Bureau Yuzhong District Branch, Chongqing, 400013, China; 3. Research Institute of Biological Effects of Electromagnetic Radiation, Preventive Medicine College of the Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of Notch1 on the adipocyte differentiation of bone marrow adipocyte progenitor cells (BMAPCs). **Methods** The femoral and tibial bone marrow of SD rats was sampled in a sterile manner to prepare cell suspension, which was cultivated by differential adhesion method. The cell surface marker expression was analyzed and detected by flow analysis; the molecular expression of adipose related genes and Notch signaling was detected by means of real-time qPCR. Notch1 gene silencing experiment was divided into non-carrier group and Notch1 small RNA interference group. The interference efficiency was detected by Western blotting; cell fat induction was conducted by STEMPRO[®] Adipogenesis Differentiation Kit. **Results** BMAPCs expressed CD34, CD44, CD45 and CD90, and six fat-related genes and Notch signaling molecule; fat induction promoted the expression of Notch1 mRNA ($P < 0.01$); Notch1 small RNA interference inhibited the expression of Notch1 protein ($P < 0.05$). The levels of Cebpa, Lpl and Ppar γ , Slc2a4 and Fabp4 mRNA in Notch1 small RNA interference group were significantly lower than those in the control group, while the level of pread1 mRNA increased greatly ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); Notch small RNA interference

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2014BI01B00); 国家自然科学基金(No.81170316); 云南省科技计划项目(20111HB050, 2013DA004)

作者单位: 650032 昆明, 成都军区昆明总医院细胞生物治疗中心、干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合实验室、云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室、昆明医科大学成都军区昆明总医院临床学院(王金祥,白盈盈,周芳,蔡学敏,刘菊芬,李自安,朱光旭,潘兴华); 重庆市公安局渝中区分局物证鉴定所(王小华); 第三军医大学预防医学院电磁辐射生物学效应研究所(余争平)

通讯作者: 朱光旭; E-mail: zhguxu@aliyun.com; 潘兴华; E-mail: panxinghua@aliyun.com