

# 自体 CIK 细胞及 DC 细胞联合索拉非尼治疗晚期肝癌的临床观察

李建旺 彭大为 黄春珍 元建华

**【摘要】** 目的 观察晚期肝癌患者行自体 CIK 细胞及树突状细胞联合索拉非尼治疗的临床疗效及不良反应。方法 采用患者自体外周血进行细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)及树突状细胞(dendritic cell, DC)扩增,并应用流式细胞术检测其 CIK、DC-CIK 表型,然后采取静脉回输方法,对原发性肝癌进行自体的 CIK 细胞及 DC 细胞联合索拉非尼治疗。结果 索拉非尼联合 1 个疗程 DC-CIK 治疗后 CR 0 例,PR 15 例,MR 22 例,SD 5 例,PD 2 例,总缓解(CR + PR + MR)率为 84.1%。患者免疫功能提高,生活质量改善。结论 自体 CIK 细胞及树突状细胞联合索拉非尼治疗晚期肝癌患者疗效尚可,不良反应可耐受。

**【关键词】** 晚期肝癌;索拉非尼;CIK 细胞;DC 细胞;过继免疫疗法

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1001-5930(2011)05-0459-03

## Autologous CIK and DC Combined with Sorafenib in The Treatment of Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Clinical Observation

Li Jiang-wang, PENG Da-wei, HUANG Chun-zheng, et al. Department of Oncology, People's Hospital of Haikou (Xiangya Haikou Hospital of Central-south University), Haikou, 570208

**【Abstract】 Objective** To analyze the clinical efficacy and side effects in patients with advanced hepatic cancer treated with Sorafenib and autologous CIK and CD. **Methods** Cytokine-induced killer cells (cytokine induced killer, CIK) and dendritic cells (Dendritic Cell, DC) from the peripheral blood of the patients with advanced hepatocellular carcinoma were amplified. The amplified CIK and DC - CIK were transfused back, and Sorafenib was given to the patients, after the phenotype of CIK and DC-CIK was tested by using the flow cytometry. **Results** After one course of treatment, 0 of the 44 patients had CR, and 15, 22, 5, and 2 of the 44 patients had PR, MR, SD, and PD disease, with a total remission rate (CR + PR + MR) of 84.1%. Sorafenib and autologous transfusion of CIK and CD improved the immune function and quality of life. **Conclusion** Autologous CIK and DC transfusion combined with Sorafenib may have good efficacy with accepted toxicities.

**【Key words】** Advanced hepatocellular carcinoma; Sorafenib; CIK cells; DC cells; Adoptive immunotherapy

(The Practical Journal of Cancer, 2011, 26: 459 ~ 461)

体内回输免疫活性细胞的过继免疫疗法是继手术、放疗、化疗之外的另一种重要的肿瘤治疗方法。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced kiuer, CIK)兼具 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和 NK 非 MHC 限制性杀瘤细胞功能,且体内外增殖能力强<sup>[1]</sup>,是一类杀瘤活性和杀瘤谱更强的新型抗肿瘤效应细胞。体内回输树突状细胞(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<sup>[2]</sup>,有效抵制肿瘤细胞的免疫逃逸机制<sup>[3]</sup>。DC 与 CIK 是肿瘤免疫治疗的 2 个重要部分,前者识别病原,激活获得性免疫系统,后者通过发挥自身细胞毒性和分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞,两者联合确保了 1 个高效和谐

的免疫反应的完成。本研究小组进行了自体 DC- CIK 细胞采用静脉回输联合索拉非尼治疗 44 例晚期原发性肝癌患者,并将其近期疗效报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病例选择

选择海口市人民医院肿瘤科 2008 年 1 月 ~ 2010 年 3 月经检查确诊为晚期原发性肝癌的患者 44 例,经影像学确诊但无法行手术及放疗治疗。在 DC-CIK 治疗前进行索拉非尼分子靶向治疗,索拉非尼 400 mg/次,2 次/天,连续服用 4 周。12 周为 1 个疗程,如无明显不良反应则重复疗程。治疗期间每周查血常规 1 次,每月查肝功能 1 次,白细胞计数  $< 3 \times 10^9/L$  或肝功能异常时停药 8 周后进行评价,对药物反应性好及可耐受治疗者停药 2 ~ 4 周重复下一周期治疗。患者

作者单位:570208 海口市人民医院(中南大学湘雅医学院附属海口医院)肿瘤科

通讯作者:彭大为

均签署知情同意书。索拉非尼分子靶向治疗与 DC-CIK 治疗间隔时间在 2 周以上,患者肝病灶肿瘤 2 cm × 3 cm 至 14 cm × 10.8 cm 大小之间,含肝硬化、门静脉及下腔静脉癌栓、腹腔积液、黄疸、远处转移患者。

## 1.2 DC 和 CIK 细胞培养和扩增

治疗细胞数量及重量模拟入院后行 MRI 检查,根据 MRI 确定肿瘤大小,计算出肿瘤体积。采血前 24 h 应用 GM-CSF 行外周血干细胞动员。

1.2.1 细胞分离 经 CS-3000 血细胞分离机分别采集患者的外周血 5 L 中的新鲜抗凝外周血单核细胞,再用聚蔗糖 400 (Ficoll 400) (中国科学院生物物理研究所) 分离后经 Hank's 液洗 3 次,收集纯度在 90% 以上的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMNC)。

1.2.2 CIK 细胞体外培养和扩增 PBMNC 调整浓度为  $1 \times 10^6/L$ ,第 1 天加入 rh-干扰素 1 000 U/mL,第 2 天开始加入抗 CD3 单抗 50  $\mu g/mL$ ,IL-1a 100 U/mL,IL-2 1000 U/mL,连续培养 3 天,更换含有上述因子的培养液 1 次,连续培养 10~20 天。每周 2 次测定白细胞增殖率和 CD3、CD56 阳性细胞率,当细胞数扩增达到设计目标,阳性目标细胞达到 85% 时,进行细胞治疗。

1.2.3 DC 细胞的体外培养和扩增 将 CS-3 000 分离得到的 PBMNC(调整浓度为  $1 \times 10^6/L$ ) 培养 2 h,弃上清,获得贴壁单核细胞,向每孔加入完全培养基,GM-CSF 100 ng/mL,IL-4 500 U/mL,培养 5 天后加入 HSP 复合物 1 ng/mL,在培养 7 天后就可收集悬浮的 DC。每份全血可收获  $1.2 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8$  DC,无菌检验合格后,可以按方案给患者治疗。

1.2.4 DC 和 CIK 细胞共培养 将致敏过的 DC 与未经致敏的 DC 计数后,以 DC:CIK = 1: 3 的比例和 CIK 细胞混合,用 CIK 培养液培养产生 DC-CIK 细胞。DC-CIK 共培养物和 CIK 细胞的增殖性能比较于共培养当日起用台盼蓝拒染法计数,动态观察 DC 共培养物的表型变化,分别于细胞培养的第 9 天检测 DC 表面标记 CD40,CD80,HLA-DR 和第 9,14 天检测 CIK 和 DC-CIK 共培养物表面标记 CD3,CD56,CD4,CD8。

## 1.3 治疗方案

患者口服索拉非尼治疗完成 1 个月,2 周后回输 CIK 细胞和 DC 细胞,2~3 次/周,一次回输 CIK  $1 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{12}$ ,DC 细胞  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 。

## 1.4 观测指标及疗效评估

观测指标包括瘤体变化、肿瘤标志物、免疫指标、

生存期、症状、生存质量及不良反应等。疗效评估参照 Recist 对实体瘤疗效判定标准:以患者治疗前及治疗后 1 个月 CT 及 B 超检查结果进行对照比较,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、轻度缓解(MR)、稳定(SD)、进展(PD),缓解 = CR + PR + MR<sup>[4]</sup>;临床症状评价根据其积分值,积分值下降  $\geq 2/3$  为显著改善,积分下降  $1/3$  为部分改善,积分下降  $< 1/3$  为无改善<sup>[4]</sup>;生存质量评价根据患者 Karnofsky 评分和体质量;不良反应以患者主诉为依据。

## 1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.1 统计软件进行统计分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CIK 和 DC-CIK 培养结果

CIK 和 DC-CIK 共培养的增殖活性细胞因子诱导的 CIK 细胞在培养中有较高的增殖,而 DC-CIK 共培养细胞具有更高的增殖活性。细胞在第 3 天后开始增殖,第 5~6 天快速增长,培养 20 d 时,CIK 细胞和 DC-CIK 共培养的细胞增殖倍数分别为 120 和 1000。CIK 培养的第 21 天,效靶比为 5: 1 时,CIK 对 Bel-7404 细胞的细胞毒活性为 46.7%。

### 2.2 DC-CIK 细胞表型

第 9 天 CD3 + ,CD56 + 细胞占 4.89% ~ 6.92%,CD3 + ,CD8 + 细胞占 48.2% ~ 51.3%;第 14 天 CD3 + ,CD56 + 细胞占 14.78% ~ 16.82%,CD3 + ,CD8 + 细胞占 76.2% ~ 78.3%;第 21 天 CD3 + ,D56 + 细胞占 46.89% ~ 56.92%,CD3 + ,CD8 + 细胞占 68.4% ~ 88.5%,见表 1。

表 1 CIK 细胞免疫治疗前后患者外周血免疫学指标变化( $\bar{x} \pm s, \%$ )

免疫指标	治疗前	治疗后	P 值
CD3 +	42.72 $\pm$ 7.34	71.38 $\pm$ 9.25	<0.01
CD4 +	24.33 $\pm$ 2.98	35.77 $\pm$ 4.38	<0.01
CD8 +	21.36 $\pm$ 3.47	28.29 $\pm$ 2.76	<0.05
CD4 + /CD8 +	1.37 $\pm$ 0.26	1.58 $\pm$ 0.12	<0.05
CD16	5.45 $\pm$ 0.38	9.24 $\pm$ 0.66	<0.01
CD56	23.84 $\pm$ 5.17	26.41 $\pm$ 4.05	<0.05

### 2.3 疗效观察

患者经 1 个疗程 DC-CIK 静脉回输治疗后自觉症状改善,食欲增强,睡眠改善,疼痛减轻,体重无明显下降,体力较前好转,见表 2。索拉非尼治疗的不良反应减轻,腹腔积液吸收,黄疸完全消退,转氨酶治疗后恢

复正常,肿瘤生长缓慢,右肝病灶减少 15%。索拉非尼联合 1 个疗程 DC-CIK 治疗后 CR 0 例,PR 15 例,MR 22 例,SD 5 例,PD 2 例,总缓解率为 84.1%。

表 2 44 例患者 CIK 免疫治疗前后患者临床症状改善分析

症状	治疗前(例)	治疗后(例)	缓解率(%)	P 值
疲乏无力	14	2	85.7	0.01
失眠	22	4	81.8	0.01
食欲不振	29	4	86.2	0.01

## 2.4 不良反应

不良反应一般在回输 1~2 h 出现。存在不同程度的发热,其中低热 8 例,高热 2 例,持续时间在 2~8 h,除 1 次采用解热镇痛药外,其余均自行消退。回输后行血常规、肝肾功检查,均未发现明显改变。

## 3 讨论

原发性肝癌具有起病隐匿、病程短、进展快、程度高、生存期短等特点,发现时多属晚期,故临床治疗难度大,患者生活质量差,病死率高,严重危害着人类的生命和健康。治疗肝癌的还有化疗、放疗方法以及其他多种治疗方法,如化学栓塞、皮下注射乙醇或乙酸和肝移植等,但是,这些治疗方法预后效果不甚理想。

索拉非尼(sorafenib),商品名:多吉美,是 1 种多靶点的抗肿瘤药物,属多激酶抑制药。索拉非尼具有双重抗肿瘤效应,一方面,它可以通过抑制 RAF/MEK/ERK 信号传导通路,直接抑制肿瘤生长;另一方面,它又可通过抑制 VEGFR 和 PDGFR 而阻断肿瘤新生血管的形成,间接抑制肿瘤细胞的生长。

一个大样本的安慰药对照的索拉非尼治疗肝癌的方案:索拉非尼组 PR 占 2.3%,安慰药组为 0.7%,SD 分别为 71.0% 和 67.0%,PD 分别为 18.0% 和 24.0%;4 个月无恶化率分别为 62.0% 和 42.0%,中位恶化时间分别为 24.0 和 12.3 周( $P < 0.01$ )<sup>[5]</sup>。

我国原发性肝癌的主要病因是乙型肝炎病毒慢性感患者均存在不同程度的免疫功能缺陷,这可能与机体外周血中 DC 数量减少,功能减低有关。有实验证实,肝癌患者 CIK 的增殖速度较正常人慢,且增殖倍数也有所降低<sup>[6]</sup>,体内注射 DC 细胞,DC 与 T 细胞结合后,大量分泌 IL-12,诱导 Th1 型应答,有利于肿瘤清除。DC 尚能分泌多种趋化因子,作用于初始 T 细胞,增强 T 细胞活性。DC 与 CIK 共培养后产生的细胞群体比同原 CIK 细胞具有更强的增殖活性。CIK 与 DC 相结合,不仅提高了 CIK 细胞的细胞毒作用,也能显

著提高 DC 的功能<sup>[7]</sup>。DC 与 CIK 混合培养时,两者能相互调节而增加细胞因子释放和增强细胞毒性,显著提高 CIK 细胞的增殖能力和杀伤活性,临床治疗效果优于 CIK 等其他效应细胞。

由于过继免疫治疗效果与效应细胞的治疗次数和投给数量有关,适当增加治疗次数和数量,可进一步提高疗效。本研究小组平均治疗 3 周,细胞总数达到了个性化设计的数量。CIK-DC 细胞联合治疗,患者症状明显改善,生活质量提高,索拉非尼副反应减轻,显示对不宜进行手术或化疗晚期的肝癌患者具有改善症状、提高生活质量的作用,但远期疗效及其对患者生存期的影响,仍需长期随访。本例在回输过程中,有 2 次寒战、发热,无其他明显不良反应,患者发热原因可能是在回输的 DC-CIK 悬液中含有 IL-2 和人血白蛋白之故,均可自行消退,无其他不适,充分说明 DC-CIK 治疗的安全性<sup>[8]</sup>。这种典型的个性化生物治疗模式,具有独特的优势和良好的抗肿瘤作用,为肝癌患者的治疗提供了新的治疗手段。

## 参考文献

- [1] 张有顺,黄玲,杨红玲,等.肝癌患者 CIK 细胞的诱导及对肝癌细胞毒作用的研究[J].上海免疫学杂志,2003,23(3):201.
- [2] Banchereaul J,Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature,1998,392:245.
- [3] Schott M,Seisslar J. Dendritic cell vaccination: new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies[J]. Trends Endocrinol Metab,2003,14(4):156.
- [4] 鲍锋,徐岩,尹富华,等. CIK 细胞过继免疫治疗中晚期恶性肿瘤的临床研究[J]. 辽宁医学杂志,2003,17(4):187.
- [5] Simpson D,Keating GM. Sorafenib: in hepatocellular carcinoma[J]. Drugs,2008,68(2):251.
- [6] 杜清友,刘明旭,王福生,等. CIK 细胞体内外抗肝癌细胞应用[J]. 中国癌症杂志,2001,11(4):325.
- [7] Wang QJ, Wang H, Pan K, et al. Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK[J]. Chin J Cancer,2010,29(7):641.
- [8] Shi M, Zhang B, Tang ZR, et al. Autologous cytokine-induced killer (CIK) cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2004,10(8):1146.

(收稿日期 2011-07-18 修回日期 2011-09-03)

(编辑:甘艳)