

DC-CIK细胞免疫疗法对原发性肝癌患者免疫功能的影响及临床意义

侯光华¹, 郝建军², 时昭红², 胡启江¹ (1.武汉市黄陂区人民医院内三科, 武汉 430300; 2.武汉市中西医结合医院消化内科, 武汉 430022)

摘要: 目的 探讨树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)免疫疗法对原发性肝癌患者免疫功能的影响及临床意义。方法 随机选取2013年至2015年于武汉市黄陂区人民医院确诊并行肝动脉化疗栓塞术(TACE)的90例原发性肝癌患者进行前瞻性分析, 随机分为治疗组和对照组, 治疗组50例, 行肝癌切除术, 术后给予DC-CIK细胞治疗; 对照组40例, 仅行肝癌切除术。治疗结束后统计两组患者的治疗总有效率、免疫功能、生活质量及不良反应等情况。结果 经DC-CIK细胞治疗后, 治疗组患者的CD3⁺、DC₁/DC₂、和CD4⁺/CD8⁺均升高, 与治疗前相比差异有统计学意义(*t*值分别为1.64、0.54和0.39, *P*值分别为0.032、0.038和0.029)。治疗组32%(16/50)的患者生活质量得到改善, 显著高于对照组的17.5%(7/40), 差异有统计学意义($\chi^2 = 12.6, P = 0.045$)。治疗组总有效率为90%(45/50), 对照组为72.5%(29/40), 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.70, P = 0.04$)。经治疗, 治疗组患者的Th1细胞由(8.5 ± 3.3)%升高至(12.9 ± 4.4)%, Th2细胞由(5.6 ± 2.5)%下降至(4.6 ± 1.7)%, 差异有统计学意义(*t* = 0.025、0.028, *P* = 0.041、0.039)。结论 经DC-CIK细胞免疫治疗后, 原发性肝癌患者的免疫功能显著增强, 治疗总有效率较高, 且对患者的生存质量有一定的改善。

关键词: 原发性肝癌; 树突状细胞; 细胞因子; 免疫功能

Clinical effects of DC-CIK cell therapy on immune function of patients with primary liver cancer

HOU Guang-hua¹, HAO Jian-jun², SHI Zhao-hong², HU Qi-jiang¹ (Department of the Third Internal Medicine, People's Hospital of Huangpo District, Wuhan 430300, China; 2. Department of Gastroenterology, Integrated TCM and Western Medicine Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical effects of dendritic cells-cytokine induced killer cells (DC-CIK) immunotherapy on immune function in patients with primary liver cancer. **Methods** Total of 90 patients with primary liver cancer who underwent TACE from 2013 to 2015 in People's Hospital of Huangpo District were randomly selected and divided into treatment group (50 cases) and control group (40 cases). Patients in treatment group were given hepatectomy and DC-CIK cell therapy and patients in control group were given hepatectomy only. After treatment, the total effective rate, immune function, quality of life and adverse reactions were analyzed. **Results** After treatment, the levels of CD3⁺, DC₁/DC₂ and CD4⁺/CD8⁺ in treatment group were significantly higher than those in control group (*t* = 1.64, 0.54, 0.39; *P* = 0.032, 0.038, 0.029). In treatment group, the life quality of 32% (16/50) patients improved, which was significantly higher than that in the control group [17.5% (7/50), $\chi^2 = 12.6, P = 0.045$]. After DC-CIK cell therapy, Th1 in treatment group increased from (8.5 ± 3.3)% to (12.9 ± 4.4)% and Th2 decreased from (5.6 ± 2.5)% to (4.6 ± 1.7)%, the differences were statistically significant (*t* = 0.025, 0.028, *P* = 0.041, 0.039). **Conclusion** After DC-CIK therapy, the immune function of patients with primary liver cancer increased significantly, the treatment efficiency and the life quality also had some improvement.

Key words: Primary liver cancer; Dendritic cell; Cytokine induced killer cells immunity

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 具有转移

快、恶性程度高、治疗后复发快和预后差等特点。其年病死率占有恶性肿瘤的第2位^[1,2], 在我国属于高发恶性肿瘤。原发性肝癌的临床表现为肝

区疼痛、肿大以及上消化道出血导致的乏力和消瘦。并发症主要有肝性昏迷、癌肿破裂出血及继发感染^[3]。目前肝癌的治疗手段主要有外科治疗(肝脏移植和肝脏切除等)和非外科治疗(免疫治疗及动脉化疗栓塞等)^[4]。经肝动脉化疗栓塞(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)已成为无手术指征或不愿进行手术患者的首选治疗方案。但TACE术后患者免疫功能下降,更容易导致肿瘤的复发、转移、感染及引起并发症等^[5]。提高TACE术后的疗效和患者的生存质量、遏制病灶的转移以及降低复发率成为临床上亟待解决的问题。随着细胞免疫学和分子生物学的发展,肝脏的细胞免疫治疗已经开始应用于临床并取得了较好的疗效。本研究随机选取2013年至2015年于本院确诊并进行治疗的90例原发性肝癌患者,探讨树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(dendritic cells-cytokine-induced killer cells, DC-CIK)免疫治疗法对原发性肝癌患者治疗前后免疫功能的影响及临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2013年至2015年武汉市黄陂区人民医院收治并确诊的90例肝癌患者进行前瞻性研究,其中男性53例,女性37例;平均年龄(53.65 ± 10.82)岁;肿瘤直径3.5~7.5 cm; Child-Pugh分级均为A、B级;临床分期为I和II期^[6]。所有患者在治疗前均未使用其他免疫抑制剂且均进行外科治疗切除肿瘤,病灶无转移,以随机试验原则将患者分为治疗组和对照组。治疗组50例,行肝癌切除术,术后给予DC-CIK细胞治疗(患者及患者家属在治疗前签署知情同意书);对照组40例,行肝癌切除术,术后仅接受常规治疗。纳入标准:①临床症状、病理学检查及超声明确诊断为肝癌患者;②研究对象均经手术切除肿瘤同时清扫其淋巴结;③研究对象病理经确诊后无转移;④所有研究对象治疗前均未使用激素类及免疫抑制剂类药物。排除标准:①患有其他较严重的心脏、肝脏和肾脏疾病患者;②存在精神异常和认知障碍的患者;③未遵医嘱服用相关干扰本研究类药物患者;④其他不适合参与此临床试验的患者。

1.2 主要试剂和仪器 主要试剂包括:rh-IFN- γ 、CD3McAb、rh-IL-2、人血白蛋白、特异性肿瘤抗原、rh-GM-CSF、抗CD3-PE、抗CD4-PE、CD8-PE、抗CD16-PE、CD56-PE、MDM、DMEM和T细胞亚群试剂盒(均选自上海生物制品研究所)。主要仪器包括:离心机、冰箱、二氧化碳恒温培养

箱、光学显微镜及超净工作台等(上海姚氏仪器设备厂)。

1.3 DC-CIK细胞的培养 利用离心机分离患者外周血单个核细胞约50 ml,用AIMV无血清培养基调整细胞浓度,置于二氧化碳培养箱中培养。收集非贴壁细胞和贴壁细胞,将贴壁细胞加入粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和白细胞介素-4培养8天获得DC细胞。用MDM调整非贴壁细胞的浓度,然后依照顺序先后加入IFN- γ 、CD3-McAb及白细胞介素-2,继续培养1周左右获得CIK细胞。将DC细胞和CIK细胞按5:1的比例混合培养3天得DC-CIK细胞。参加DC-CIK细胞培养的人员均符合上岗要求。

1.4 DC-CIK细胞回输 将DC-CIK细胞经过离心、洗涤及重悬后制成细胞悬液250 ml,经静脉于1小时内输回治疗组患者体内,每两天进行1次,持续4次为1个疗程,进行3个疗程,对照组则仅接受常规治疗。

1.5 DC细胞亚群与T细胞亚群测定 所有患者于治疗前抽取静脉抗凝血4 ml,进行相应的T细胞亚群(CD8⁺、CD3⁺、CD2⁺和CD4⁺)与DC细胞亚群的测定。

1.6 随访 随访观察各组患者的生存质量。

1.7 疗效判定 治疗结束8周后与治疗前瘤体大小进行比较,缓解:瘤体彻底无显现且持续1个月以上;部分缓解:肿瘤直径缩小一半以上,维持1个月以上;病情稳定:瘤体两径乘积缩小25%以上但<50%,无新病灶出现,维持1个月以上;无效:瘤体两径乘积缩小<5%^[7]。缓解、部分缓解及病情稳定均视为治疗有效。

1.8 生活质量评分标准 以Karnofsky评分体系^[8]为标准,根据治疗前后评分变化作为评价患者生活质量的依据。若患者治疗后Karnofsky增加分数大于10分即为生活质量改善,增加0~10分为稳定,减少10分以上认为生活质量降低。

1.9 统计方法 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验分析不同组之间的差异;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的一般资料 治疗组患者共50例,其中男性31例,女性19例,平均年龄(52.69 ± 8.37), Child-Pugh分级均为A、B级,临床分期为I和II期;对照组患者共40例,其中男性22例,女性18例,平均年龄(51.34 ± 9.62)岁,肿瘤直径1.4~2.6 cm, Child-Pugh分级均为A、B级,临床

分期为 I 和 II 期。两组患者的性别、年龄、Child-Pugh 分级、临床分期及肿瘤直径等资料差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表 1。

2.2 两组患者的临床效果 治疗组 50 例患者中缓解 5 例, 部分缓解 23 例, 病情稳定 17 例, 无效 5 例, 治疗总有效率为 90% (45/50)。对照组 40 例患者中完全缓解 1 例, 部分缓解 12 例, 病情稳定 16 例, 无效 11 例, 治疗总有效率为 72.5% (29/40)。两组患者的治疗总有效率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.70, P = 0.04$), 见表 2。

2.3 治疗组患者治疗前后外周血 T 细胞亚群和 DC 细胞亚群的变化 治疗组患者接受 DC-CIK 细胞持续灌输治疗后外周血 CD8⁺ 占外周血单个核细胞百分比为 (29.3 ± 9.1)%, 高于治疗前的 (26.1 ± 7.2)%, 差异有统计学意义 ($t = 0.62, P = 0.036$); 治疗后 DC₁/DC₂ 为 1.50 ± 0.32, 高于治疗前的 1.21 ± 0.24, 差异有统计学意义 ($t = 0.54, P = 0.038$); 治疗后 CD4⁺/CD8⁺ 为 1.57 ± 0.45, 显著高于治疗前的 0.91 ±

0.25, 差异有统计学意义 ($t = 0.39, P = 0.029$)。治疗后 DC₁、DC₂、CD3⁺ 和 CD4⁺ 均高于治疗前, 差异均有统计学意义 (t 值分别为 0.92、0.83、1.64 和 1.37, P 值分别为 0.045、0.042、0.032 和 0.041), 见表 3。

2.4 两组患者治疗前后生活质量的变化 治疗组 50 例患者中 16 例生活质量显著提高, 28 例无变化, 6 例生活质量降低; 对照组 40 例患者中 7 例生活质量显著提高, 26 例无变化, 7 例生活质量降低, 差异有统计学意义 (χ^2 值分别为 12.6、8.91、10.1, P 值分别为 0.045、0.022、0.038), 见表 4。

2.5 外周血辅助 Th 细胞 Th1/Th2 分化情况 治疗前原发性肝癌患者 Th1 细胞比例为 (8.5 ± 3.3)%, Th2 细胞比例为 (5.6 ± 2.5)%, 经 3 个疗程的 DC-CIK 细胞治疗后, Th1 细胞显著上升, Th2 细胞显著下降, 差异有统计学意义 ($t = 0.025、0.039, P = 0.041、0.039$), 见表 5。

2.6 DC-CIK 细胞治疗的不良反应 DC-CIK 细胞治疗

表 1 两组原发性肝癌患者的一般资料 (例)

| 组别 | 例数 | 男/女 (例) | 年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁) | Child-Pugh 分级 | |
|-------|-------------------|------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| | | | | A 级 (例) | B 级 (例) |
| 治疗组 | 50 | 31/19 | 52.69 ± 8.37 | 38 | 12 |
| 对照组 | 40 | 22/18 | 51.34 ± 9.62 | 31 | 9 |
| 统计量值 | $\chi^2 = -0.183$ | $\chi^2 = 0.321$ | $t = 0.436$ | $\chi^2 = -0.155$ | $\chi^2 = 0.264$ |
| P 值 | 0.541 | 0.613 | 0.716 | 0.554 | 0.675 |

| 组别 | 临床分期 | | 肿瘤直径 | |
|-------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | I 期 (例) | II 期 (例) | < 5 cm (例) | ≥ 5 cm (例) |
| 治疗组 | 34 | 16 | 31 | 19 |
| 对照组 | 29 | 11 | 26 | 14 |
| 统计量值 | $\chi^2 = -0.217$ | $\chi^2 = 0.233$ | $\chi^2 = 0.016$ | $\chi^2 = 0.028$ |
| P 值 | 0.711 | 0.562 | 0.576 | 0.629 |

表 2 两组原发性肝癌患者的临床效果

| 组别 | 例数 | 缓解 (例) | 部分缓解 (例) | 病情稳定 (例) | 无效 (例) | 总有效率 [例 (%)] |
|------------|----|--------|----------|----------|--------|--------------|
| 治疗组 | 50 | 5 | 23 | 17 | 5 | 45 (90.0) |
| 对照组 | 40 | 1 | 12 | 16 | 11 | 29 (72.5) |
| χ^2 值 | - | - | - | - | - | 5.70 |
| P 值 | - | - | - | - | - | 0.04 |

注: “-” 为无相关数据

表 3 治疗组患者治疗前后外周血 T 细胞亚群和 DC 细胞亚群的变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | DC ₁ (%) | DC ₂ (%) | DC3 ⁺ (%) | DC4 ⁺ (%) | DC8 ⁺ (%) | DC ₁ /DC ₂ | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|-------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 治疗前 | 0.92 ± 0.01 | 0.85 ± 0.14 | 56.12 ± 6.50 | 21.25 ± 10.00 | 26.14 ± 7.20 | 1.21 ± 0.24 | 0.91 ± 0.25 |
| 治疗后 | 1.00 ± 0.21 | 0.90 ± 0.06 | 66.24 ± 5.30 | 38.73 ± 7.00 | 29.39 ± 9.10 | 1.50 ± 0.32 | 1.57 ± 0.45 |
| t 值 | 0.92 | 0.83 | 1.64 | 1.37 | 0.62 | 0.54 | 0.39 |
| P 值 | 0.045 | 0.042 | 0.032 | 0.041 | 0.036 | 0.038 | 0.029 |

表4 两组原发性肝癌患者治疗前后生活质量的比较 [例 (%)]

| 组别 | 提高 | 无变化 | 降低 |
|--------------|-----------|-----------|----------|
| 治疗组 (n = 50) | 16 (32.0) | 28 (56.0) | 6 (12.0) |
| 对照组 (n = 40) | 7 (17.5) | 26 (65.0) | 7 (17.5) |
| χ^2 值 | 12.60 | 8.91 | 10.10 |
| P值 | 0.045 | 0.022 | 0.038 |

表5 原发性肝癌患者 DC-CIK 细胞治疗前后外周血 Th1 及 Th2 的变化 ($\bar{x} \pm s$, %)

| 时间 | Th1 | Th2 | Th1/Th2 |
|-----|------------|-----------|---------|
| 治疗前 | 8.5 ± 3.3 | 5.6 ± 2.5 | 1.52 |
| 治疗后 | 12.9 ± 4.4 | 4.6 ± 1.7 | 2.80 |
| t值 | 0.025 | 0.039 | 0.047 |
| P值 | 0.041 | 0.039 | 0.043 |

过程中可能出现的主要不良反应有皮疹、寒战、过敏和发热等,需密切观察患者进行DC-CIK细胞治疗过程中及回输后1~3.5小时内是否出现上述症状或者其他不良反应,根据实际情况具体操作,给予正确及时的处理。本研究中,在DC-CIK细胞回输治疗后7例患者在4小时内出现了37.4~38.1℃的低烧,经物理降温(酒精擦拭)2小时内恢复正常;4例患者出现了皮疹,进行抗过敏对症治疗后均恢复正常。其余患者未出现类似的不良反应。

3 讨论

原发性肝脏恶性肿瘤起源于肝脏的上皮或间叶组织,是危害极大的恶性肿瘤之一。肝癌恶性程度高,发展迅速,患者平均年龄为44岁,若治疗不及时或治疗方案选择不当,平均生存时间仅为半年^[9]。肝癌早期可无症状,一旦出现明显症状后约33%已属晚期。由于种种原因,多数患者只能选择TACE或放疗、化疗进行治疗,但这并不能完全清除病灶,有时甚至会对患者的免疫系统造成损伤^[10]。有研究表明,人的免疫系统主要由辅助性T细胞(CD4⁺)与杀伤性T细胞(CD8⁺)相互作用形成,CD4⁺/CD8⁺通常为1.51~2.10,肿瘤患者因机体免疫监视功能降低,常表现为CD4⁺下降,CD8⁺上升,进而导致CD4⁺/CD8⁺下降^[11-17]。

CD4⁺/CD8⁺在一定程度上代表了人体当前的免疫状况。原发性肝癌患者的免疫功能往往较低,若要提高患者的治疗效果,就需要提升患者的免疫力^[18-21]。本研究发现患者经过DC-CIK细胞连续灌输治疗后,CD4⁺/CD8⁺比值显著上升,并促进Th1细胞水平的上升且生活质量显著改善,病情得到有效缓解,治疗的总有效率达45%。治疗后患者的食欲增加,精神状态显著改善,不良反应的发

生率低,表明DC-CIK细胞疗法安全可靠。本研究中,治疗组治疗后Th1细胞为(12.9 ± 4.4)%,Th2细胞为(4.6 ± 1.7)%,已接近正常人群水平^[11]。由此可见,肝癌切除术后给予DC-CIK细胞治疗,患者的细胞分化状况有所改善。

综上所述,经DC-CIK细胞疗法后,原发性肝癌患者的免疫功能显著增强,治疗总有效率较高,且对患者的生存质量有一定的改善。

参考文献

- [1] 徐静,刘传苗.原发性肝癌177例临床分析[J].蚌埠医学院学报,2013,38(3):275-277.
- [2] 佟立权,赵海峰,尤立光,等.TACE术联合自体CIK细胞治疗原发性肝癌的临床研究[J].中国普通外科杂志,2013,22(7):876-879.
- [3] Cabibbo G, Maida M, Genco C, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) treated by percutaneous radio-frequency ablation (RFA) is affected by complete radiological response[J]. PLoS One, 2013, 8(7):e70016.
- [4] 首志雄.原发性肝癌的多学科治疗进展[J].临床误诊误治,2013,26(5):103-106.
- [5] 和刚,杨岭,张顺.自体CIK回输对转移性恶性肿瘤细胞免疫指标变化的影响[J].实用肿瘤杂志,2014,29(1):45-48.
- [6] 中华人民共和国卫生部.原发性肝癌诊疗规范[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(10):929-946.
- [7] 郭伟伟,刘莉,吴德华.DC-CIK细胞免疫治疗联合TACE术治疗原发性肝癌[J].南方医科大学学报,2014,34(5):674-678.
- [8] 苏红艳,刘也夫.胎盘多肽联合TACE方案治疗晚期原发性肝癌的临床研究[J].现代药物与临床,2015,30(3):283-286.
- [9] Chan SL, Mok T, Ma BB. Management of hepatocellular carcinoma: beyond sorafenib[J]. Current oncology reports, 2012, 14(3):257-266.
- [10] 邓武坚,陈锦武,罗颖嘉,等.微创治疗联合自体CIK细胞输注对肝癌的疗效及安全性研究[J].岭南现代临床外科,2013,13(1):29-31.
- [11] 马洪波,黄涛,韩风,等.DC-CIK细胞联合手术治疗原发性肝癌的临床研究[J].重庆医科大学学报,2012,35(11):980-983.

- [12] 尤振宇, 苏晓辉, 刘洋. DC-CIK生物治疗联合肝动脉灌注化疗治疗肝癌的短期临床观察[J]. 河北医药, 2013, 35: 1626-1628.
- [13] 李雪峰. 血清5项指标联合检测对原发性肝癌的诊断探讨[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(5): 569-570.
- [14] 宋娟, 钱程. CIK细胞免疫治疗在原发性肝癌中的应用及对免疫活性细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(23): 2386-2390.
- [15] Murata S, Mine T, Ueda T, et al. Transcatheter arterial chemoembolization based on hepatic hemodynamics for hepatocellular carcinoma[J]. ScientificWorldJournal, 2013, 2013: 479805.
- [16] 王春花, 胡冰. CIK免疫治疗对肿瘤患者生活质量影响的观察[J]. 安徽医药, 2013, 17(3): 406-408.
- [17] 唐云强, 江鹏, 何璐, 等. 三维重建联合超声引导下射频消融治疗肝癌的疗效分析[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(9): 678-682.
- [18] Takuma Y, Takabatake H, Morimoto Y, et al. Comparison of combined transcatheter arterial chemoembolization and radiofrequency ablation with surgical resection by using propensity score matching in patients with hepatocellular carcinoma within Milan criteria[J]. Radiology, 2013, 269(3): 927-937.
- [19] 覃清清, 韦劲松, 许瑞琪, 等. 健脾扶正汤对晚期原发性肝癌患者生活质量的影响[J]. 中医学报, 2013, 28(5): 632-634.
- [20] 陆群英, 李坚, 彭海燕, 等. 柴芍六君子汤对晚期原发性肝癌患者生活质量的影响[J]. 中医学报, 2014, 29(5): 637-638.
- [21] NIU LZ, LI JL, ZENG JY, et al. Combination treatment with comprehensive cryoablation and immunotherapy in metastatic hepatocellular cancer[J]. World J Gastroenterology, 2013, 19(22): 3473-3478.

收稿日期: 2016-06-01

侯光华, 郝建军, 时昭红, 等. DC-CIK细胞免疫疗法对原发性肝癌患者免疫功能的影响及临床意义[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2016, 8(4): 82-86.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

声 明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊已被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》、《美国化学文摘数据库(Chemical Abstracts Service)》、《中国学术期刊网络出版总库》、《中国核心期刊遴选数据库》(万方数据——数字化期刊群)及CNKI中国知网数据库收录, 其作者论文著作权使用费及相关稿酬一次性给付(已在收取发表费时折减和换算为杂志赠阅)。凡作者向本刊提交文章发表之行为即视为同意本刊上述声明。

本刊编辑部