

• 论 著 •

树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞免疫治疗对恶性肿瘤化疗后患者免疫功能的影响

陈冬波, 张世强, 王保庆, 张兰胜, 王自全

(徐州医学院第二附属肿瘤内科, 江苏徐州 221006)

摘要:目的 探讨树突状细胞(DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)治疗对化疗后肿瘤患者免疫功能的影响。方法 采集化疗后恶性肿瘤患者外周血单个核细胞,经体外诱导产生DC和CIK细胞,每个患者接受DC与CIK细胞治疗至少2个疗程;采用流式细胞术检测21例健康者和48例肿瘤患者化疗前后及DC联合CIK治疗后外周血淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NK细胞及CD4⁺/CD8⁺比值。结果 肿瘤患者外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺及NK细胞数量低于健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);化疗后外周血CD3⁺、CD4⁺、NK细胞及CD4⁺/CD8⁺比值较化疗前降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),但化疗前后CD8⁺均值变化无统计学意义($P>0.05$)。DC与CIK细胞回输后外周血CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺及NK细胞均高于回输前,CD8⁺低于回输前,但CD3⁺、CD4⁺仍低于健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 恶性肿瘤患者化疗后免疫力降低,应用DC与CIK细胞免疫治疗,可提高恶性肿瘤患者的免疫功能。

关键词:细胞因子诱导的杀伤细胞; 树突状细胞; 细胞,培养的; 免疫疗法; 肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)05-0571-02

Effect of DC and CIK Cell on the Immune Function of Cancer Patients After Chemotherapy

Chen Dongbo, Zhang Shiqiang, Wang Baoqing, Zhang Lansheng, Wang Ziquan

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: Objective To explore the effect of dendritic cell (DC) and cytokine inducing killer (CIK) cell treatment on the immune function of cancer patients after chemotherapy. **Methods** DC and CIK were prepared from peripheral blood mononuclear cells of cancer patients; to detect the mean values of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK cell and CD4⁺/CD8⁺ ratio by flow cytometry in 21 healthy controls 48 cancer patients. **Results** Compared with healthy control group, the mean values of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK cell and CD4⁺/CD8⁺ ratio in cancer patients significantly decreased ($P<0.05$); The mean values of CD3⁺, CD4⁺, NK cell and CD4⁺/CD8⁺ ratio more significantly decreased than those in patients after chemotherapy ($P<0.05$), the mean CD8⁺ values remained stable ($P>0.05$), but after treatment with DC and CIK cell, The mean values of CD3⁺, CD4⁺, NK cell and CD4⁺/CD8⁺ were significantly higher than that after chemotherapy, the CD8⁺ was significantly lower than that after chemotherapy, and the CD3⁺, CD4⁺ was still significantly lower than that of healthy controls ($P<0.05$). **Conclusion** Chemotherapy may inhibit the immunological response of cancer patients. And the use of DC and CIK cell can improve the patients' immune function after chemotherapy.

Key words: Cytokine-Induced Killer Cells; Dendritic Cells; Cells, Cultured; Immunotherapy; Neoplasms

恶性肿瘤患者机体免疫功能发生紊乱,化疗作为治疗肿瘤的常规方法广泛运用,但在杀伤肿瘤细胞的同时对机体免疫功能也造成一定程度的损害^[1]。本研究通过检测化疗后回输树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)前后恶性肿瘤患者外周血淋巴细胞免疫表型的变化,观察DC与CIK细胞回输对化疗后恶性肿瘤患者免疫功能的影响,为临床应用提供试验依据。

1 资料与方法

1.1 资料 48例恶性肿瘤患者均经病理细胞学检查证实,男38例,女10例,平均年龄49岁(32~78岁);其中胃癌8例,结肠癌5例,肺癌20例,食管癌3例,乳腺癌4例,前列腺癌3例,卵巢癌3例,宫颈癌2例。所有患者化疗4~6周期,治疗前通过医院伦理委员会批准,并签治疗知情同意书。按TNM国际分期法:Ⅲ期18例,Ⅳ期30例;Karnofsky评分大于或等于60分,预计生存期大于3个月;DC与CIK细胞回输前心、肝、肾功能及血常规大致正常,均于化疗结束后1个月后进行DC与CIK细胞回输治疗,所有患者均接受DC与CIK细胞治疗

至少2个疗程。

1.2 细胞增殖 动态观察细胞增殖,采用标准白细胞计数方法,计算每毫升中的细胞总数。

1.3 流式细胞仪检测免疫表型 采集健康者和肿瘤患者化疗前后及DC与CIK细胞治疗后4W外周血,流式细胞仪检测淋巴细胞的免疫表型变化,体外细胞分离、培养扩增过程均在符合GMP标准的本院细胞治疗中心进行。先用荧光抗体标记所测物,抗体组合为:CD3-CY5、CD8-PE和CD3-FITC、CD56-PE,避光反应15~20 min,配制单细胞悬液。全血样本先用甲酸溶血,离子强度调节剂调节离子浓度,1.0%多聚甲醛固定,3 000 r/min离心5 min,2~3次,加生理盐水溶解稀释后上机检测。

1.4 DC、CIK细胞的制备与回输

1.4.1 单个核细胞分离与培养 CS-3000细胞分离机无菌分离肿瘤患者外周抗凝淋巴细胞单采混悬液约80 mL。将采集的淋巴细胞单采混悬液加到含50 U/mL肝素生理盐水洗涤,2 500 r/min离心15 min,去上清液,生理盐水稀释后,200目筛

网过滤。将稀释混悬液沿管壁缓慢加到含 15 mL 淋巴细胞分离液的离心管中,2 000 r/min 离心 20 min,收集单个核细胞,生理盐水洗涤 3 次。取收集的细胞沉淀,用无血清培养基稀释至 60 mL,200 目筛网过滤,混匀,均分至 4 个 250 mL 培养瓶中,37 ℃、5%CO₂ 培养贴壁 2 h。

1.4.2 DC 细胞培养与回输 轻轻振荡培养瓶,吸出悬浮细胞,每瓶加入含白细胞介素-4 500 U/mL,重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子 1 000 U/mL 的无血清培养基 25 mL,37 ℃、5%CO₂ 培养 72 h,第 4 天加入肿瘤坏死因子-α 500 U/mL 诱导 DC 成熟,以后每隔 3 d 用 2/3 量换液,补足细胞因子,并分别在第 7、9、11、13 天收集 1 瓶 DC,配成 1 mL,分 6~8 个点分别在化疗后患者双侧腋窝、锁骨下或腹股沟淋巴结注射。

1.4.3 CIK 细胞培养与回输 将吸出的悬浮细胞离心去上清液,重新用无血清培养基悬浮至 180 mL,加入 CD3 单克隆抗体 50 ng/mL,白细胞介素-2 500 U/mL,分 6 瓶,37 ℃、5%CO₂ 培养,第 4 天用 2/3 量换液,另加入白细胞介素-2 500 U/mL,白细胞介素-1 100 U/mL,干扰素-γ 1 000 U/mL,以后每隔 3 d 换液 1 次,补足细胞因子。分别在第 11、13 天收集细胞,生理

盐水洗涤 3 次,混入 1%人血清蛋白生理盐水溶液静脉回输给化疗后患者,同时给予白细胞介素-2 100 万 U 连续静滴 13 d。

1.5 统计学处理 使用 SPSS11.5 统计软件,组间数据行 *t* 检验,以 *P*<0.05 有统计学意义。

2 结 果

肿瘤患者化疗前 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK 细胞均低于健康对照组(*P*<0.05)(详见表 1),说明肿瘤患者的机体免疫功能明显低于健康者。肿瘤患者化疗后外周血 CD3⁺、CD4⁺、NK 细胞含量以及 CD4⁺/CD8⁺比值较化疗前降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);化疗前后 CD8⁺均值变化差异无统计学意义(*P*>0.05),说明肿瘤患者化疗后免疫功能进一步下降。DC 与 CIK 细胞回输后肿瘤患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK 细胞均高于回输前(*P*<0.05),但 CD8⁺低于回输前(*P*<0.05),说明化疗后行 DC 与 CIK 细胞回输治疗可显著增强机体的细胞免疫功能;DC 与 CIK 细胞治疗后 CD3⁺、CD4⁺细胞其绝对数值仍低于健康对照组(*P*<0.05),说明尽管细胞免疫功能逐步得到改善,但未恢复至正常水平(详见表 2)。

表 1 健康对照组和肿瘤患者化疗前外周血淋巴细胞亚群比较

组别	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK
健康对照组	61.37±5.13	43.26±6.12	30.15±4.67	1.71±0.39	23.01±8.52
恶性肿瘤组	57.89±4.75	39.13±5.93	27.65±3.98	1.43±0.41	18.11±6.64
<i>t</i> 值	2.7331	2.1375	2.2762	2.6481	2.5823
<i>P</i> 值	0.0128	0.0158	0.0339	0.0154	0.0177

表 2 48 例肿瘤患者化疗前后及 DC 与 CIK 治疗后淋巴细胞亚群比较

淋巴亚群	化疗前	化疗后	DC 与 CIK 治疗后
CD3 ⁺	57.89±4.75	55.62±4.43 ^a	59.37±5.27 ^c
CD4 ⁺	39.13±5.93	34.82±5.76 ^a	39.78±6.02 ^c
CD8 ⁺	27.65±3.98	26.13±3.47 ^b	24.38±3.35 ^c
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.43±0.41	1.27±0.34 ^a	1.47±0.42
NK	18.11±6.64	15.61±5.37 ^a	18.43±5.72 ^c

^a:与化疗前比较,*P*<0.05;^b:与化疗前比较,*P*>0.05;^c:与化疗后比较,*P*<0.05。

3 讨 论

随着临床肿瘤免疫学研究的不断深入,发现肿瘤的发生、发展及预后与宿主的免疫系统异常或失调有着密切的关系,以免疫治疗为主的肿瘤生物治疗已被公认为继手术、放化疗后的第 4 种肿瘤治疗模式。大部分恶性肿瘤患者就诊时已处于肿瘤晚期,需要行肿瘤内科化疗,研究表明^[2-3],化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,也损伤机体的免疫机能,使患者的免疫功能进一步降低。

在 T 细胞亚群中,CD4⁺细胞主要为辅助性 T 细胞(Th 细胞),能促进 B 细胞增殖、分化及产生抗体,同时能促进 CD8⁺T 细胞活化,产生 CTL 细胞。CD8⁺细胞主要为杀伤性/抑制性 T 细胞,肿瘤患者外周血的 CD8⁺细胞主要是抑制性 T 细胞

(Ts 细胞)。恶性肿瘤患者体内 Th 细胞减少,Ts 细胞增多,CD4⁺/CD8⁺比值逐渐变小,甚至倒置,表现为免疫监视功能降低,不能控制肿瘤的发展。

DC 和 CIK 细胞是肿瘤免疫治疗的重要部分,两者联合可以确保高效的免疫反应^[6-12]。因此,本研究通过检测肿瘤患者外周血淋巴细胞的免疫表型的表达,探讨 DC 与 CIK 细胞治疗对化疗后肿瘤患者免疫功能的影响。研究结果显示,与健康人群比较,恶性肿瘤患者化疗前 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ NK 细胞均明显降低,差异具有显著性,其原因可能与肿瘤组织释放的一些可溶性物质或免疫抑制因子有关,这些物质经血液循环入胸腺后抑制 T 细胞方向分化,从而造成 CD3⁺、CD4⁺T 细胞亚群下降,导致细胞免疫功能低下;化疗后恶性肿瘤患者 CD3⁺、CD4⁺及 NK 细胞均明显低于化疗前,提示化疗可进一步杀伤淋巴细胞及其亚群,从而降低肿瘤患者的细胞免疫功能,这可能与化疗药物的骨髓毒性有关,国内亦有类似的研究结果报道^[3]。化疗 1 月后行 DC 与 CIK 细胞回输治疗的肿瘤患者其 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK 细胞均有升高,差异具有统计学意义(*P*<0.05),说明化疗后应用 DC 及 CIK 细胞回输可显著改善肿瘤患者的免疫功能,有助于提高机体的抗肿瘤免疫效应,但是 CD3⁺、CD4⁺细胞仍低于正常组(*P*<0.05),说明尽管 DC 与 CIK 细胞回输治疗后患者的免疫功能逐步得到改善,但还未达到正常水平。另外,DC 与 CIK 细胞回输治疗的过程中,我们发现仅有 2 例患者出现低热副反应,未出现其他不良反应,可能与回输的细胞液中含有 IFN-γ 和(下转第 575 页)

导的急性相反应的假说,急性相反应时血清中包括 C 反应蛋白在内的蛋白质水平将发生显著变化,被称为急性相蛋白质(此外还包括纤维蛋白、 α -酸性糖蛋白、 α -抗胰蛋白酶等)。细胞因子则是一类由免疫活性细胞产生的具有调节机体造血和免疫系统的生理功能的 α 分子多肽或蛋白,它们相互影响,相互制约,形成复杂的细胞因子调节网络参与炎症免疫。而且有研究表明 IL-18 与 C 反应蛋白等存在明显相关性^[13],提示 IL-18 也是一种炎症蛋白,并可作为炎症状态的一个标志物。因此,作者认为糖尿病患者中 IL-18 升高所反映的微炎症状态是导致肾脏损伤的主要原因,但这些炎症物质是怎样损伤到肾脏的结构,仍然需要进一步研究。

参考文献

- [1] Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000, 9(4): 427-434.
- [2] 程申应, 李培林, 胡芳, 等. SDS-AGE 尿蛋白电泳对肾脏损伤部位的实验诊断分析[J]. 国际医学检验杂志, 2010, 31(3): 285-286.
- [3] Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(7): 1677-1689.
- [4] van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291: 456-464.
- [5] Ichimura T, Hung CC, Yang SA, et al. Kidney injury molecule-1 (Kim-1): a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(3): 552-563.
- [6] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-

1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury[J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 4135-4142.

- [7] Park KM, Byun JY, Kramers C, et al. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to pro-longed protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney[J]. J Biol Chem, 2003, 278(14): 27256-27266.
- [8] Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(2): 517-529.
- [9] Dinarello CA. IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103(1): 11-24.
- [10] Swaak AJ, van den Brink HG, Aarden LA. Cytokine production (IL-6 and TNF α) in whole blood cell cultures of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Scand J Rheumatol, 1996, 25(2): 233-238.
- [11] Li ZG, Mu R, Dai ZP, et al. T cell vaccination in systemic lupus erythematosus with autologous activated T cells[J]. Lupus, 2005, 14(15): 884-889.
- [12] Pick JC, Crock MA. Is type 2 diabetes mellitus a disease of the innate immune system[J]. Diabetologia, 1998, 41(8): 1241-1248.
- [13] 伍锦泉, 潘志铤, 陈玉平, 等. 慢性肾功能衰竭患者血浆白介素 18 水平与微炎症反应及动脉粥样硬化的关系[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2005, 3(8): 127-129.

(收稿日期: 2010-09-10)

(上接第 572 页)

IL-2 有关。

因此,化疗后序贯应用 DC 与 CIK 细胞免疫治疗是安全的,可明显改善化疗后肿瘤患者的机体免疫力,从而可能进一步发挥对残存肿瘤细胞零级动力学的杀伤作用,降低肿瘤复发的危险性,提高肿瘤的综合治疗效果。

参考文献

- [1] 王桂芝, 秦文华. 化疗对肿瘤患者淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华全科医学, 2009, 7(12): 1307-1308.
- [2] 熊彪, 邹尤宝. 大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(10): 892-893.
- [3] 高碧燕, 金从国, 卢玉波, 等. 宫颈癌患者新辅助化疗与放疗前后外周血 T 细胞亚群变化的研究[J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(3): 248-250.
- [4] Shebzukhov YV, Koroleva EP, Khlgatian SV, et al. Humoral immune response to thymidylate synthase in colon cancer patients after 5-FU chemotherapy[J]. Immunol Lett, 2005, 100(1): 88-93.
- [5] 匡志鹏, 梁安民. CIK 细胞和 DC 的免疫生物学特性及抗肿瘤研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(2): 338-340.
- [6] 魏绪仓, 连小云, 赵文理, 等. DC-CIK 细胞的生物学活性及抗淋巴

瘤细胞的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(3): 283-285.

- [7] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1345-1353.
- [8] 江凤翔, 吴云林. DC-CIK 细胞抗肿瘤的基础研究及临床应用进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(6): 618-620.
- [9] 徐艳, 刘丽娟, 高建梅. DC-CIK 细胞特异性抗肿瘤生物学活性研究[J]. 中国现代医生, 2010, 27(8): 8-10.
- [10] Chen BA, Li M, Sun ZY, et al. Killing activity in DC and CIK co-culture against hepatocarcinoma cells[J]. Zhong Guo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2006, 14(3): 543-546.
- [11] 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): 641-648.
- [12] Wei XC, Zhai XH, Han XR, et al. Biological activity of DC-CIK cells and its effect against leukemia cells in vitro[J]. Zhong Guo Shi Yan Xue Yi Xue Za Zhi, 2008, 16(5): 1150-1153.

(收稿日期: 2010-10-06)