论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0408-03

自体树突状细胞疫苗诱导胃癌患者术后肿瘤特异性免疫反应的作用

汪 灏,余佩武,赵永亮,石 彦,吴 森,曾冬竹,蔡志民 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胃癌术后患者应用树突状细胞(dendritic cells,DCs)疫苗治疗后机体肿瘤特异性免疫反应的变化。**方法** 采用外周血单个核细胞及自体肿瘤抗原在体外制备DCs疫苗,皮下注射胃癌术后患者,每周1次,共治疗4次。在治疗前后相应各时相点检测针对自体肿瘤抗原的迟发性超敏反应(delayed-type hypersensitivity,DTH),外周血单个核细胞混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reacion,MLR)及细胞上清IFN-γ及IL-4的水平。**结果** 疫苗治疗后可以明提高外周血单个核细胞混合淋巴细胞反应的强度。治疗前及治疗后第2、4、8周患者外周血单核细胞(peripheral blood monocyte cell,PBMC)分泌IFN-γ的水平分别为(184±20)、(467±55)、(700±88)、(257±38) pg/ml,各组差异显著;而分泌IL-4的水平分别为(66±8)、(69±9)、(66±7)、(61±7) pg/ml。各组之间无明显变化。有16例疫苗注射后患者DTH反应呈阳性。**结论** 树突状细胞疫苗可改善胃癌术后患者免疫功能状态,并诱导出了肿瘤特异性的免疫反应。

关键词:树突状细胞;胃肿瘤;混合淋巴细胞反应

中图法分类号:R392.12;R730.51;R735.2 **文献标识码**:A

Tumor specific immune response in postoperative gastric cancer patients induced by dendritic cells vaccine

WANG Hao, YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang, SHI Yan, WU Miao, ZENG Dong-zhu, CAI Zhi-ming (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate tumor specific immune response in postoperative patients with gastric cancer induced by dendritic cells vaccine. **Methods** Dendritic cells were produced and pulsed with self tumor antigens *in vitro*. Twenty-five patients with gastric cancer were treated with DCs vaccinations. DCs vaccine was administered subcutaneously once a week for 4 times to the postoperative patients after they finished chemotherapy. PBMC mixed lymphocyte reactions (MLR) and delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions to self tumor lysates were measured in vitro before and after the vaccinations. **Results** The level of IFN-γ released by PBMC of patients were (184±20), (467±55), (700±88), (257±38) pg/ml before and 2, 4 and 8 weeks after vaccination respectively and IL-4 level was (66±8), (69±9), (66±7), (61±7) pg/ml. The intensity of MLR and the level of IFN-γ in PBMC supernatant increased significantly after vaccination, while the IL-4 level in PBMC supernatant had no significant changes. Sixteen patients developed delayed type hypersensitivity reactions to tumor lysates after immunization. **Conclusion** The dendritic cells vaccine can induce antigen specific immunity in postoperative patients with gastric cancer.

Key words: dendritic cells; gastric neoplasm; mixed lymphocyte reaction

树突状细胞(dendritic cells,DCs)是体内功能最强的抗原递呈细胞,在激发机体特异性的细胞免疫反应中处于核心地位。肿瘤机体内DCs的功能受到严重抑制[1],无法有效提呈抗原,其所刺激的T淋巴细胞往处于无能状态。我们的前期研究表明,将DCs在体外活化然后回输治疗大鼠,可以诱导胃癌特异性的T淋巴细胞反应,并使肿瘤消退[2]。在众多动物试验成功的基础上[3,4],DCs在肿瘤临床中的应用正在逐步开展,并取得了一定进展[5]。我们在前期研究基础上,采用自体肿瘤抗原刺激制备DCs疫苗,然后治疗胃癌术后患者,观察其对胃癌患者肿瘤特异性免疫反应的诱导。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究对象为我科2001年9月至2003年2月收治的经手术

作者简介:汪 灏(1971-),男,江苏省兴化市人,博士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤综合治疗方面的研究,发表论文12篇。电话:(025)83943396

通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com

收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-08-26

治疗的胃癌患者25例,无远处转移灶或转移灶已切除,无急、慢性炎症,无自身免疫性疾病。平均年龄57.8岁,其中男性17例,女性8例。按国际抗癌联盟(UICC)TNM分期标准,TNMⅠ期3例,Ⅱ期8例,Ⅲ期7例,Ⅳ期7例。按病理分型:高分化腺癌5例,中分化腺癌6例,低分化腺癌9例,黏液腺癌3例,印戒细胞癌2例。

1.2　DCs疫苗的制备及鉴定[6,7]

无菌采集患者抗凝全血100 ml,分离外周血单个核细胞(PBMC),贴壁法去除非贴壁细胞,获得单核细胞。加RPMI 1640完全培养基、GM-CSF、IL-4使其终浓度为:GM-CSF 100 ng/ml,IL-4 50 ng/ml。患者切除肿瘤后留取肿瘤组织制成细胞悬液,液氮反复冻融得肿瘤裂解抗原。培养DCs至第5天,加入肿瘤抗原,至第7天加入TNF-α 20 ng/ml,第8天收获的细胞为负载肿瘤抗原的DCs疫苗。采用流式细胞术鉴定DCs疫苗表型HLA-DR、CD80、CD83的表达率[8]。

1.3　临床治疗

手术后治疗常规给予化疗8~10次,化疗方案5-氟尿嘧啶500 mg静滴1/d;羟基喜树碱10 mg静滴1/d。待化疗结束后2周开始进行DCs疫苗治疗,每周1次,共注射4次。采用在四肢的淋巴引流区轮流皮下注射的方法。接种部位第1次为右上肢,第2次为左上肢,第3次为左下肢腹股沟区,第4次右下肢腹股沟区,每周1次。每次均为皮下注射,5×10^6个细胞/次。

1.4　临床观察

治疗期间详细观察患者症状,体征变化。试验中密切观察是否出现各种副作用,并详细记录。

1.5　迟发性超敏反应(delayed-type hypersensitivity,DTH)

分别于疫苗治疗前,治疗后2、4和8周进行检测。上臂外侧皮内注射肿瘤全抗原0.1 ml,48 h后观察直径大于5 mm判断为阳性。

1.6　混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reacion,MLR)

留取DCs疫苗治疗前后的胃癌患者的外周血单个核细胞,再加入自体肿瘤抗原刺激,检测其增殖能力及分泌细胞因子的能力。具体方法如下:取外周血10 ml,以淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,然后用PBS悬浮细胞1 500 r/min,离心10 min,洗细胞1次。1 000 r/min,5 min,洗细胞两次。用冻存液悬浮细胞。于-170 ℃液氮冻存待测。待全部标本收集齐后(疫苗治疗前,治疗后2、4和8周),将PBMC复苏,RPMI1640培养基培养24 h后加入肿瘤抗原刺激48 h,37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养3 d。对照组加入正常白蛋白作为无关抗原,培养同肿瘤抗原组。培养结束前12 h两组均加入稀释的^{3}H-TdR,每孔实际放射比活度为1 μCi。ZT-II型多头细胞收集器和"49"型玻璃纤维滤纸、大量PBS冲洗收集细胞,10%三氯乙酸及无水乙醇洗涤固定。滤纸片以60 ℃烘干后放入盛有闪烁液的计数瓶中、Beckman液闪计数仪测量cpm值。

收集淋巴细胞反应上清,行ELISA法检测IFN-γ、IL-4的(购自深圳晶美公司)浓度。具体操作按试剂盒说明进行。

1.7　统计学分析

采用SPSS统计程序包作单因素方差分析和t检验。

2　结果

2.1　DCs疫苗表型的检测

经检测,DCs疫苗高表达成熟DCs表面标志物,HLA-DR、CD80、CD83的表达率分别达82.5%、90.0%、87.5%。

2.2　临床观察

截止2003年5月,接受DCs疫苗治疗患者最长已达20个月,最短3个月,有1例患者于术后12个月因腹腔广泛转移死亡,其余患者近期疗效满意,目前尚未发现复发或转移。有2例患者于疫苗治疗后24 h内出现发热,分别达38.2 ℃和38.5 ℃,予以对症处理,体温2 d内自行恢复正常。未发现皮疹等情况。

2.3　迟发性超敏反应

恶性肿瘤患者接受免疫治疗后,观察肿瘤抗原注射局部皮肤反应结果,25例患者中有7例患者第2次注射后48~72 h内局部皮肤出现红肿、硬结,4例患者于第3次注射后阳性,5例患者于第4次注射后阳性,此16例患者硬结直径范围为5~15 mm。

2.4　混合淋巴细胞反应

结果显示,疫苗注射2周后,外周血单个核细胞在自体肿瘤抗原刺激下,细胞增殖能力明显提高,于疫苗注射后4周达到最高,治疗后8周略有下降,但仍比对照组高。各时相点相比差异显著($P<0.05$)。对照组细胞增殖能力较肿瘤抗原组明显低下,各时相点相比无显著差异($P>0.05$)。见表1。

表1　DCs疫苗治疗后外周血单个核细胞混合淋巴细胞反应($n=25$, $\bar{x}\pm s$, cpm)

抗原类型	疫苗注射前	注射后2周	注射后4周	注射后8周
肿瘤抗原	677±124	1 538±288[a]	2 816±324[ab]	2 021±317[abc]
无关抗原	356±110	493±155	388±98	425±188

a:$P<0.01$,与疫苗注射前比较;b:$P<0.05$,与注射后2周比较;c:$P<0.05$,与注射后4周比较

2.5　淋巴细胞反应上清IFN-γ、IL-4的浓度

结果显示,疫苗注射两周后,外周血单个核细胞在自体肿瘤抗原刺激下,培养上清液的IFN-γ水平明显上升,于疫苗注射后4周达到最高,治疗后8周IFN-γ水平明显下降,各时相点相比差异非常显著($P<0.01$)。外周血单个核细胞在肿瘤抗原刺激下上清液的IL-4水平各时相点之间无明显差异($P>0.05$)。见表2,3。

表2　DCs疫苗治疗前后外周血单个核细胞分泌IFN-γ水平的变化($n=25$, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

抗原类型	疫苗注射前	注射后2周	注射后4周	注射后8周
肿瘤抗原	184±20	467±55[a]	700±88[ab]	257±38[abc]
无关抗原	68±18	81±23	52±19	57±21

a:$P<0.01$,与疫苗注射前比较;b:$P<0.01$,与注射后2周比较;c:$P<0.01$,与注射后4周比较

表3 DCs疫苗治疗前后外周血单个核细胞分泌 IL-4 水平的变化（$n=25$，pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

抗原类型	疫苗注射前	注射后2周	注射后4周	注射后8周
肿瘤抗原	66±8	69±9	66±7	61±7
无关抗原	72±15	58±21	60±10	59±9

3 讨论

外科手术是胃癌的主要根治方法。然而半数以上患者在确诊时已有远处转移或亚临床转移灶，致使患者最终死于复发或远处转移。因此，如何控制复发、消灭亚临床转移灶是提高疗效，治愈胃癌的关键。放化疗由于副作用及其对机体的免疫抑制作用影响其应用。抗肿瘤免疫治疗是继手术、化疗、放疗后肿瘤治疗的第4种模式。肿瘤特异性免疫治疗是以激发肿瘤抗原特异性杀伤T淋巴细胞（tumor-specific cytolytic T lymphocytes，CTL）为基础的肿瘤免疫疗法，抗原提呈细胞在此过程中发挥了重要作用。树突状细胞具有超强的激活初始T细胞和诱导初次免疫应答的能力，在调节T细胞应答类型方面起极为重要的作用[9]。但是，在肿瘤的微环境中，DCs的免疫能力明显下降。将机体内的DCs及其前体提取，在体外扩增活化，并予以相应的抗原刺激，然后回输，进行过继免疫治疗，可恢复并加强DCs的抗肿瘤免疫的作用[10]。

肿瘤的消灭最终还是需要机体特异性免疫反应将其杀伤，T淋巴细胞是这一反应的执行者。我们前期的动物实验已证实DCs疫苗可在动物体内激发抗原特异性的免疫反应，本试验观察到，DCs疫苗注射两周后，肿瘤患者外周血单个核细胞在自体肿瘤抗原刺激下，细胞增殖能力明显提高。肿瘤患者外周血单个核细胞在给予自体肿瘤抗原刺激的情况下，其培养上清液的IFN-γ水平明显上升，于疫苗注射后4周达到最高，治疗后8周IFN-γ水平明显下降，但仍比对照组高。提示DCs疫苗注射后诱导出了肿瘤抗原特异性的T细胞反应。我们还发现机体的肿瘤抗原特异性免疫反应的诱导及维持具有一定的时限性，疫苗注射后4周其免疫反应最强，治疗后8周左右有所下降。这对于我们以后进一步优化疫苗的治疗方案具有一定的参考价值。

观察瘤苗注射局部皮肤DTH反应，在25例患者中有16例患者出现了针对自体肿瘤抗原的阳性反应，也提示DCs疫苗治疗后机体出现了明显的针对自体肿瘤抗原的特异性免疫应答，但免疫反应的强弱不同。这可能与患者的个体差异如患者年龄，肿瘤分期等有关。

我们认为，将患者外周血单核细胞在体外予以诱导，肿瘤裂解抗原刺激，制备DCs疫苗，然后回输胃癌患者，可以诱导出明确的针对胃癌裂解抗原的特异性免疫反应。这为胃癌的免疫治疗提供了新的方法。

参考文献：

[1] ISHIGAMI S, AIKOU T, NATSUGOE S, *et al*. Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer[J]. Oncology, 1998, 55(1): 65-69.

[2] 雷 晓，余佩武，石 彦，等. 树突状细胞肿瘤疫苗诱导抗胃癌作用的实验研究[J]. 中华胃肠外科杂志，2002，5(1)：45-48.

[3] FIELDS R C, SHIMIZU K, MULE J J. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(16): 9482-9487.

[4] MAYORDOMO J I, ZORINA T, STORKUS W J, *et al*. Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines[J]. Stem Cells, 1997, 15(2): 94-103.

[5] 汪 灏，郝 群，余佩武. 树突状细胞疫苗在肿瘤临床治疗中的应用[J]. 中国肿瘤临床，2003，30(12)：901-904.

[6] NESTLE F O, ALIJAGIC S, GILLIERT M, *et al*. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells[J]. Nat Med, 1998, 4(2): 328-332.

[7] HOLTL L, RIESER C, PAPESH C, *et al*. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells[J]. J Urol, 1999, 161(3): 777-782.

[8] 汪 灏，余佩武，郝群，等. 临床用的抗肿瘤树突状细胞疫苗的制备及保存[J]. 第三军医大学学报，2004，26(14)：1314-1316.

[9] BANCHEREAU J, STEINMAN R M. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392(6673): 245-252.

[10] 吴 森，余佩武，曾冬竹，等. 负载NDV-ATV的树突状细胞诱导的抗胃癌效应研究[J]. 消化外科，2005，4(3)：211-214.

（编辑 陈聪连）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数

本刊编辑部