维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)05－0648－04

人自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗对肝癌术后免疫功能的影响

高 建,陈 敏,任 红

(重庆医科大学附属第二医院肝病治疗中心,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨人自体肝癌细胞裂解物致敏的树突状细胞(DC)瘤苗对肝癌术后免疫功能的影响。方法:从肝癌患者外周血单个核细胞中诱导 DC,用重组人粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子(rhGM－CSF)和白介素－4(rhIL－4)刺激活化,经自体肝癌细胞裂解物致敏制备 DC 瘤苗。将 30 例肝癌术后患者随机分为 DC 瘤苗治疗组 15 例,化疗对照组 15 例。对两组病例治疗前后免疫功能、临床疗效进行观察比较。结果:DC 瘤苗治疗后外周血 $DC3^+$、$DC4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞比率较治疗前明显升高,$P<0.05$,且明显高于对照组化疗后的 $DC3^+$、$DC4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞比率;DC 瘤苗治疗后外周血 IgG、IgM、IgA 等体液免疫指标较治疗前有一定程度的改善,但差异无显著性,$P>0.05$;DC 瘤苗治疗后血清 IL－10 水平明显下降,$P<0.05$。结论:肝癌术后行自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗治疗,可改善患者的细胞免疫和体液免疫水平,且不良反应少,值得推广应用。

【关键词】树突状细胞;原发性肝癌;免疫功能;免疫治疗

【中国图书分类法分类号】R512 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－02－17

Effects of dendritic cells pulsed with autologous hepatoma cell lysates on the immune function of the postoperative patients with hepatocellular carcinoma

GAO Jian, et al

(*Institute of Hepatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate effects of dendritic cells (DCs) pulsed with autologous hepatoma cell lysates on the immune function of the postoperative patients with hepatocellular carcinoma(HCC). *Methods*: DCs isolated from peripheral blood mononuclear cell of HCC patients were cultured and proliferated in vitro by using rhGM－CSF and rhIL－4, and then were pulsed with autologous hepatoma cell lysates. 30 postoperative patients with HCC were randomly divided into 2 groups. 15 cases were treated with dendritic cell vaccine. 15 cases received only chemotherapy and were established as control group. Immune function、clinical effects in two groups of patients were compared and observed. Results: The levels of $DC3^+$、$DC4^+/CD8^+$ and NK cell in the DC vaccine group significantly increased after vaccination, while those of the control group had no significant changes. The levels of IgG、IgM、IgA in the DC vaccine group increased after vaccination, but didn't reach statistical significance. The concentration of IL－10 in the DC vaccine group significantly decreased after vaccination($P<0.05$). *Conclusion*: The hopatome cell lysates pulsed DC vaccines can improve the immune function of the postoperative patients with HCC. This method results in fewer side effects and should be recommended.

【Key words】Dendritice cell; Hepatocellular carcinoma; Immune function; Immunotherapy

肝癌手术切除后能否根治,最关键的是防止复发和转移,目前所用的化疗或放疗往往不仅杀死了肿瘤细胞,也摧毁了机体的免疫功能,最终难以根治。近年来,以 DC 为基础的肿瘤疫苗已在肾癌、黑色素瘤等肿瘤治疗中取得明显效果[1,2],但对肝癌的实验研究和临床应用尚处于探索阶段。我们前期的研究显示,经人自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗体外可有效的诱导特异性抗肝癌免疫[3]。本研究从肝癌患者术后外周血单个核细胞中诱导 DC,用 rhGM－CSF 和 rhIL－4 等细胞因子刺激活化,经自体肝癌细胞裂解物致敏,回输入患者体内,探讨人自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗对肝癌术后免疫功能的影响。

作者介绍:高 建(1965－),男,副教授,博士,主要研究方向:肿瘤的生物治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 研究对象

2002 年 10 月至 2003 年 9 月，我院肝胆外科手术治疗的肝癌病人 30 例，已切除转移灶或无远处转移灶，均无严重脏器功能不全，术后病理活检为肝细胞性肝癌。进入研究的患者被随机分为两组：(1)对照组 15 例，其中男性 10 例，女性 5 例，年龄(54.7±7.6)岁；(2)致敏 DC 瘤苗治疗组 15 例，其中男性 11 例，女性 4 例，年龄(52.3±7.2)岁。本研究经医学伦理委员批准，并签署知情同意书。

1.2 肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗的制备

1.2.1 肝癌细胞及其裂解物的制备

将手术切除的肝癌组织剪碎，经胶原酶 IV、DNA 酶消化后制成细胞悬液，用 100% 和 75% 的淋巴细胞分离液分离，收集管底的肝癌细胞。将部分新鲜分离的自体肝癌细胞悬于细胞冻存液中，置于液氮中冻存备用，另将 5×10^6 自体肝癌细胞 −70℃ 和 37℃ 下，反复冻融、筛网研磨、离心和超声破碎，取上清液经 0.2μm 滤膜过滤即为肝癌细胞裂解物，冻存备用。

1.2.2 树突状细胞体外培养，扩增及鉴定

取肝癌患者外周血 50ml，肝素抗凝，常规分离外周血单个核细胞，用 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞，放置 37℃，5%CO_2 孵箱中培养 2h 后，吸出未贴壁细胞(供分离 T 细胞用)，留下贴壁细胞，加入含 rhGM−CSF 1000u/ml 和 rhIL−4 500u/ml 等细胞因子的 10% AB 血清的 RPMI 1640 培养液，隔日加细胞因子(首次浓度的 1/2)和培养基(吸弃 30%，加 50%)，培养 7 天收集的细胞即为树突状细胞，通过形态学，特异性表面标记，表达功能相关分子及功能进行鉴定。

1.2.3 肝癌细胞裂解物致敏 DC 的制备

在肝癌患者外周血 DC 体外培养的第 6 天，加入肝癌细胞裂解物(120μg/ml)共培养，过夜收获悬浮和轻度贴壁的细胞即为致敏 DC。

1.3 治疗方法

1.3.1 对照组 15 例，于肝癌根治术及门静脉置泵术后 1 周接收泵入化疗，化疗方案为：表阿霉素 40mg，泵内注入，第 1、2 天，1 次/天；氟尿嘧啶(5−Fu)500mg，泵内注入，第 3，5，10，12 天，1 次/天；丝裂霉素 4mg，泵内注入，第 1，8 天，1 次/天。

1.3.2 致敏 DC 瘤苗治疗组 15 例，于肝癌根治术后 1 周开始接受自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗治疗，采用在双侧上肢轮流皮内注射，前 2 次接种为每周 1 次，间隔 3 个月再加强 1 次。剂量为 4×10^6 个细胞/次。

1.4 观察方法

1.4.1 免疫学指标的检测

自体肝癌细胞裂解物致敏 DC 瘤苗治疗前和治疗后。检测血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 等体液免疫指标，用流式细胞仪检测外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ 等 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞的比率。

1.4.2 临床观察

治疗开始前 1 周，治疗第 3 周及治疗结束后 1 周进行临床评价，包括全面的病史采集，体格检查及血常规、肝、肾功能的检查，严格观察不良反应的发生情况，患者每 3 个月复查血清中 IL−10 和 AFP，腹部 B 超或 CT 等检查。

1.5 统计学方法：

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组均数比较用 t 检验，$P<0.05$，为差异有显著性。

2 结 果

2.1 两组治疗前后免疫学指标变化

DC 瘤苗治疗组治疗后外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞的比率均有不同程度的升高，其中以 $CD3^+$、$CD4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞的比率升高明显，$P<0.05$，且明显高于对照组化疗后相应值，$P<0.05$。见表 1。

表 1 两组治疗前后细胞免疫指标变化($\bar{x}\pm s$，%)

组别	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	NK 细胞
DC 瘤苗治疗组(15 例)					
治疗前	60.81±4.83	36.27±7.15	31.63±4.12	1.15±0.21	12.73±2.08
治疗后	68.37±9.35*	38.05±8.37	30.14±5.47	1.42±0.42▲	15.59±3.17△
P 值	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05
对照组(15 例)					
治疗前	62.43±5.26	35.36±6.21	30.54±3.61	1.18±0.34	11.85±2.31
治疗后	60.13±5.21	34.21±5.83	31.38±3.73	1.12±0.26	10.72±2.45
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

注：* 表示 DC 瘤苗治疗后 $CD3^+$ 与对照组化疗后(相同时相)的比较，$P<0.05$；▲表示 DC 瘤苗治疗后 $CD4^+/CD8^+$ 与对照组化疗后(相同时相)的比较，$P<0.05$；△表示 DC 瘤苗治疗后 NK 细胞的比率与对照组化疗后(相同时相)的比较，$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 两组治疗前后体液免疫指标(g/L)和 IL－10(Pg/ml)变化($\bar{x} \pm s$)

组别	IgG	IgM	IgA	IL－10
DC 瘤苗治疗组(15 例)				
治疗前	10.53±4.85	2.68±1.07	1.43±0.85	65.32±16.73
治疗后	12.27±3.76*	2.74±1.15	1.46±0.78	41.49±11.25△
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05
对照组(15 例)				
化疗前	10.26±3.29	2.71±1.23	1.41±0.92	63.76±14.21
化疗后	9.12±2.16	2.67±1.21	1.39±0.75	54.68±13.35
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

注：* 表示 DC 瘤苗治疗后 IgG 与对照组化疗后(相同时相)的比较，$P<0.05$。△表示 DC 瘤苗治疗后 IL－10 与对照组化疗后(相同时相)的比较，$P<0.05$

DC 瘤苗治疗组治疗后外周血 IgG、IgM、IgA 等体液免疫指标较治疗前有一定程度的改善，但差异无显著性，$P>0.05$，其中 IgG 水平显著高于对照组化疗后的 IgG 水平，$P<0.05$，DC 瘤苗治疗组治疗后血清 IL－10 浓度明显下降，$P<0.05$，且明显低于对照组化疗后的相应值，$P<0.05$，见表 2。

2.2 临床观察结果

不良反应 自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗接种后，4 例患者出现发热、体温波动于 37.8℃～38.6℃，未给予特殊处理，体温均在 6～24h 内恢复正常。2 例患者瘤苗注射局部出现直径 1～2cm 的皮肤红晕，但患者均可耐受，未予特殊处理，72h 后皮肤红晕消散。瘤苗接种期间，患者均未出现恶心、呕吐、头痛等症状，无血象、肝肾功能损害及全身自体免疫性疾病的发生(如关节炎，过敏性休克等)。

3 讨 论

肝癌根治术后常因不能清除远处转移的微小病灶而易造成复发转移，故肿瘤免疫疗法成为预防肝癌术后复发转移的新希望。DC 是体内功能最强的抗原提呈细胞，能有效摄取、加工肿瘤抗原，表达高水平的 MHC－I，MHC－II 类分子及 CD80、CD86 等多种共刺激分子，并分泌多种细胞因子，在抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用[4]。但是，在肿瘤中 DC 数量有限，同时肿瘤可使 DC 功能失常、凋亡以及免疫反应中的信号转导分子缺失，致使 DC 免疫功能低下[5]。最新研究[2,3,6]表明，体外培养、扩增 DC，并用肿瘤的裂解物、凋亡的肿瘤细胞致敏 DC 回输体内，可诱导产生特异性的 T 细胞免疫杀伤肿瘤细胞，发挥抗肿瘤免疫应答。本研究从肝癌患者术后外周血单个核细胞中诱导 DC，用 rhGM－CSF 和 rhIL－4 等细胞因子刺激活化，经自体肝癌细胞裂解物致敏，回输患者体内，探讨人自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗对肝癌术后免疫功能的影响。

在肿瘤患者的外周血中常出现 T 细胞亚群的紊乱，表现为 $CD4^+$ 细胞减少，$CD8^+$ 细胞增高，$CD4^+/CD8^+$ 比值下降或倒置[7]。本研究结果发现接种自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗后，肝癌术后患者外周血 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞比率均有不同程度升高。其中以血 $CD3^+$、$CD4^+/CD8^+$ 及 NK 细胞比率升高明显，$P<0.05$。表明自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗治疗，可使肝癌术后患者的细胞免疫功能改善，有利于增强 T 细胞对肿瘤细胞的识别，诱导特异性抗肝癌免疫应答，杀灭残留癌细胞，抑制肿瘤的复发转移。

DC 瘤苗治疗所致的肿瘤的消退和生长抑制与抗原特异性免疫反应的诱导密切相关[8]。树突状细胞可通过增强 Th 细胞活性，刺激 B 细胞活化，对抗体的生成有促进作用。本研究结果显示，自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗治疗，可使肝癌术后患者 IgG、IgM、IgA 等体液免疫有一定程度的增高。其中 IgG 水平明显高于对照组化疗后的 IgG，$P<0.05$。

血清 IL－10 可作为判断肝癌预后的免疫学指标，肝癌患者血清 IL－10 水平可明显增高，单因素和多因素分析均表明 IL－10 水平高的肝癌病人预后较差[9]。本研究结果显示：肝癌术后行自体 DC 瘤苗治疗，可使血清 IL－10 水平下降，从而改善机体抗肿瘤免疫反应，抑制肝癌术后肿瘤复发转移，改善预后。

因此，肝癌术后行自体肝癌细胞裂解物致敏的 DC 瘤苗治疗，可改善患者的细胞和体液免疫水平，杀灭残留癌细胞，改善预后，且不良反应少，值得临

维普资讯 http://www.cqvip.com

床推广应用。

参 考 文 献

[1] Kuglar A, Stuhler G, Walden P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell - dendritic cell hybrids[J]. Nat Medicine, 2000; 6(3): 332 - 336.

[2] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and Clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor - derived dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2001; 61(17): 6451 - 6458.

[3] 高 建,陈 敏,彭明利,等.肝癌细胞裂解物致敏的树突状细胞瘤苗体外诱导特异性抗肝癌免疫[J].中华肝脏病杂志,2005;13(3):198 - 201。

[4] Van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, et al. Dendritic cell induced activation of adaptive and innate antitumor immunity[J]. J Immunol, 2003; 171(11): 5842 - 5852.

[5] Mailliard RB, Dallal RM, Son Yi, et al. Dendritic cells promote T cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen[J]. Immunol Invest, 2000; 29(2): 177 - 185.

[6] Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, et al. Generation of tumor - specific T - lymphocytes by cross - priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells[J]. Cancer Res, 2000; 60(13): 3542 - 3549.

[7] 杨 镇,主编.肿瘤免疫学[M].第 1 版,武汉:湖北科学技术出版社,1998;7 - 9.

[8] Lau R, Wang F, Jeffery G, et al. Phase I trial of intravenous peptide - pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma[J]. J Immunother, 2001; 24(1): 66 - 78.

[9] Chau GY, Wu CW, Lui WY, et al. Serum interleukin - 10 but not interleukin - 6 is related to clinical outcome in patients with respectable hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg, 2000; 231(4): 552 - 558.

(上接第 647 页)

[3] Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM, et al. Incorporation and integration of implanted myogenic stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements [J]. J Thorac Cardiovas Surg, 2002; 124(3): 584 - 590.

[4] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosic Res, 2000; 61(4): 364 - 370.

[5] Harada M, Itoh H, Nakagawa O, et al. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy[J]. Circulation, 1997; 96(10): 3737 - 3739.

[6] Guo WN, Kamiya K, Kada KJ, et al. Regulation of cardiac kvK+ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998; 30(1): 157 - 159.

[7] Suzuki T, Tsuruda A, Katoh SH, et al. Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rat assay of myocytes cultured in a serum - free medium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997; 29(8): 2087 - 2091.

[8] Simpson P, McGrath A, Savion S, et al. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. Circ Res, 1982; 51(2): 787 - 801.

[9] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat muocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. Cire Res, 1982; 50(1): 101 - 116.

[10] Clark WA, Decker ML, Behnke - Barclay M, et al. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long - term primary culture [J]. J Mol Cell Cardiol., 1998; 30(1): 139 - 142.

[11] Condorelli G, Borello U, De Angelis L, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for muocardium regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA., 2001; 98(19): 10733 - 10738.

[12] Wolpert L, Beddington R, Brockes J, et al. Principles of development. Edition one[M]. London, New York: Current biology Ltd&Oxford university press, 1998; 269 - 320.

[13] Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non - precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative[J]. Dev Dyn, 2000; 218(2): 383 - 393.

[14] Tomita S, Nakatani, Fukuhara S, et al. Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system[J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2002; 50(8): 321 - 324.

[15] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte - mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 126(1): 124 - 132.

[16] IijimaY, Nagai T, Mizukami M, et al. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle - derived cells into cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2003; 17(10): 1361 - 1363.