

· 论 著 ·

树突状细胞诱导的杀伤细胞治疗非霍奇金淋巴瘤患者的应用价值

李 兴¹, 马丽娜², 彭大为¹

(中南大学湘雅医学院附属海口医院/海南省海口市人民医院: 1. 肿瘤化疗科; 2. 神经内科 570208)

摘要:目的 探讨树突状细胞诱导的杀伤细胞(DC-CIK)治疗非霍奇金淋巴瘤的临床效果。方法 选取 2011 年 1 月至 2014 年 12 月该院收治的 84 例非霍奇金淋巴瘤作为研究对象,按数字表法将患者随机分为观察组与对照组,观察组患者采用 DC-CIK 治疗,对照组患者使用细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)治疗。收集培养好且细菌检测为阴性的 DC-CIK 或 CIK 细胞,应用无菌生理盐水清洗 3 次,将 Ag-DC 致敏后的 CIK 细胞离心洗涤,用 100 mL 生理盐水、25 mL 人血清蛋白和 20 万单位白细胞介素-2(IL-2)重悬细胞,2 h 内回输给患者,回输前给予患者肌注非那根 25 mg。观察并比较 2 组患者的临床治疗效果。结果 观察组患者的细胞增殖速率显著高于对照组,培养第 6 天,细胞数明显大于对照组。随培养时间的增加,DC-CIK 细胞 CD3⁺/CD8⁺、CD3⁺/CD56⁺ 的双阳性细胞比例显著高于同等条件下的 CIK 细胞,且 DC-CIK 细胞的分泌因子水平显著高于同等条件下的 CIK 细胞,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 DC-CIK 细胞治疗非霍奇金淋巴瘤具有明显的临床效果,值得进一步深入研究。

关键词:树突状细胞诱导的杀伤细胞; 非霍奇金淋巴瘤; 免疫; 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)04-0497-03

The application of DC-CIK in the treatment of non Hodgkin's lymphoma

LI Xing¹, MA Lina², PENG Dawei¹

(1. Department of Oncology; 2. Department of Neurology, Haikou Hospital affiliated

to Xiangya School of Medicine, Central South University/Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract:Objective To explore the effect of DC-CIK in the treatment of non Hodgkin lymphoma. **Methods** 84 cases of non Hodgkin's lymphoma in Haikou People's Hospital, Central South University Xiangya Medical College Hospital from January 2011 to December 2014 were selected as the research object. The patients were randomly divided into observation group and control group by digital table method. The observation group was treated with DC-CIK, and the control group was treated with CIK. Will Ag-DC centrifugal washing after the sensitization of CIK cells, with 100 mL saline, 25 mL blood albumin rIL-2 and 200 000 unit weight suspension cells, 2 hours loss to the patient's body back, back to lose before giving intramuscular injection in patients with 25 mg promethazine hydrochloride. The therapeutic effect of the two groups was observed. **Results** Cell proliferation rate in observation group were significantly higher than the control group. And in the training on the sixth day, number of cells in observation group were significantly greater than the control group. Cellular immune phenotypic differences of two groups of patients were compared, and the results showed that with the increase of incubation time, DC-CIK cells to CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ double the proportion of positive cells were significantly higher than that of the same condition of CIK cells, and DC-CIK cells secrete factors levels were significantly higher than that of the same condition of CIK cells, and the above differences are significant statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** DC-CIK cells have a very wide application prospect in the application of non Hodgkin lymphoma, which is worthy of clinical application.

Key words: DC-CIK; non Hodgkin lymphoma; immune; cell

恶性淋巴瘤是临床常见恶性肿瘤,且近年来发病率呈逐年增高趋势^[1]。尽管随着医学的不断发展,恶性淋巴瘤的治疗方法取得了较大的进展,但常规的放、化疗仍然不能够完全缓解,且存在治疗后复发的情况^[2]。细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)是将人外周血单个核细胞在体外与多种因子共同培养后,获得异质细胞,其除兼具 T 细胞的抗肿瘤活性还具有自然杀伤细胞(NK)的非 MHC 限制性细胞毒活性^[3]。该方法对非霍奇金淋巴瘤患者进行治疗能够取得较好疗效,现探讨树突状细胞(DC)与 CIK 即 DC-CIK 在非霍奇金淋巴瘤治疗中的应用价值。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2014 年 12 月该院肿瘤科收治的 84 例非霍奇金淋巴瘤患者,按数字表法将患者随机分为观察组与对照组。观察组患者 42 例,男 23 例,女 19 例,

年龄 20~81 岁,平均年龄(52.4±4.6)岁,采用 DC-CIK 进行治疗;对照组患者 42 例,男 24 例,女 18 例,年龄 19~79 岁,平均年龄(51.6±5.1)岁,使用 CIK 进行治疗。2 组患者的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P < 0.05$),具有可比性。患者均签署知情同意书,并获该院伦理委员会审批通过。

1.2 纳入标准 (1)所有患者均符合非霍奇金淋巴瘤的诊断标准。(2)无其他恶性肿瘤。(3)近 2 个月内未接受任何放疗治疗。

1.3 细胞培养与治疗方法

1.3.1 DC 的制备 (1)将采集的外周血收集至 2 支离心管,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,将沉淀细胞混合,加生理盐水至 25 mL,使沉淀细胞充分悬浮。另取 1 支离心管,加入淋巴细胞分离液 20 mL,采用滴管将血细胞悬液缓慢转移至淋巴

细胞分离液的表面,使两者之间形成清晰的界面。(2)2 000 r/min 离心 20 min 后,从管底到液面分为 4 层,依次为红细胞和粒细胞层、淋巴细胞分离液层、外周血单个核细胞层(PBMC 层)、血浆层。使用吸管将 PBMC 层吸出,转移至另 1 支离心管。(3)加生理盐水至 40 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,将沉淀细胞悬浮,加入生理盐水至 40 mL,充分混匀后,1 500 r/min 离心 5 min。共离心洗涤 3 次。(4)最后 1 次离心结束后弃上清液,将沉淀细胞均分为 3 份,分别转移至 3 个培养瓶,各加入 40 mL 的免疫细胞无血清培养液培养,分别记为 A1、A2、A3。(5)2 h 后取出培养的细胞,分别将 A1、A2、A3 中悬浮的淋巴细胞转移至另外 3 个培养瓶中,分别记为 B1、B2、B3。3 个 B 瓶中加入 IFN- γ ,第 2 天加入 IC 因子(含有 IL-2 和抗 CD3 单抗),诱导培养 CIK;3 个含有贴壁细胞的 A 瓶中各加入 40 mL 的免疫细胞无血清培养液和 H1、Hb 因子,诱导培养 DC。(6)DC 培养过程中,如有发黄,则换液,补加 H1 和 Hb 因子。

1.3.2 CIK 的制备 取患者外周血,分离出单个核细胞,采用 IMDM 培养液悬浮细胞,然后按每瓶细胞数为 1×10^7 接种至 25 cm² 的培养瓶。置于 37 ℃ 孵育箱中放置,使细胞贴壁。2 h 后收集非贴壁细胞,部分细胞用来分离 T 淋巴细胞,并每隔 3 d 更换 1 次培养液。

1.3.3 DC-CIK 的制备 首先单独将 DC、CIK 细胞培养 4 d,然后 1 : 10 混合,培养体系仍以 CIK 细胞为培养体系,培养 4 d 后相关指标进行检查。

1.3.4 细胞回输 收集培养好且细菌检测为阴性的细胞,使用无菌生理盐水清洗 3 次,并加入 10% 的人血清蛋白配置成 100 mL 后进行第 1 次回输,将 Ag-DC 致敏后的 CIK 细胞离心洗涤,用 100 mL 生理盐水、25 mL 人血清蛋白和 20 万单位白细胞介素-2(IL-2)重悬细胞,2 h 内回输给患者,观察组回输制备好的 DC-CIK 细胞,对照组则回输 CIK 细胞,回输前给予患者肌注非那根 25 mg。第 10 天换液加入 IL-2 1 000 U/mL 及 IL-15 10 ng/mL 进行第 2 次回输,第 14 天将细胞全部回输。将以上 3 次回输作为 1 个疗程,持续治疗 2 个疗程。(4)细胞采集 2 个疗程结束后的第 21 天至第 28 天,再次采集患者外周血,进行培养和检测。

1.4 观察指标 观察 2 组患者细胞增殖速率,采用 MTT 法检测细胞体外增殖速度,分别取 2 组患者外周血,应用 0.01 mol/L PBS 液清洗,用 0.125% 胰蛋白酶消化,分别接种于 96 孔培养板,每种细胞各接种 40 孔,余 16 孔作为空白对照孔。接种后第 0、1、2、3、4 天,2 种细胞各取出 8 孔,吸出培养液,PBS 清洗 2 次,每孔加入 MTT 商品名:噻唑蓝溶液(购于北京中生瑞泰科技有限公司)(5 mg/mL)20 μ L,37 ℃ 孵育 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 mL 二甲亚砜(购于上海沪宇生物科技有限公司),室温下将培养板置于振荡器上振荡 10~15 min 裂解细胞,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪(购于广州市康钰贸易有限公司)上测定每孔的光密度值,计算平均值。采用绘制细胞生长曲线的方法进行测定,将细胞个数作为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制相应曲线反映细胞的增殖速率、细胞免疫表型的差异及细胞分泌因子(采用酶联免疫组化法)情况的差异。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较使用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组患者细胞增殖速率结果比较 观察组患者细胞增殖速率显著高于对照组,培养第 6 天,细胞增殖倍数明显大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组患者细胞增殖能力结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	3 d	6 d	9 d	15 d
观察组	42	4.2 \pm 0.7	12.5 \pm 3.1*	29.4 \pm 7.6*	61.5 \pm 10.4*
对照组	42	4.1 \pm 0.6	10.4 \pm 2.9	20.0 \pm 4.5	37.9 \pm 8.9
t		0.703	3.206	6.897	11.173
P		0.484	0.002	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 2 组患者细胞免疫表型差异结果比较 随培养时间的增加,DC-CIK 细胞 CD3⁺/CD8⁺、CD3⁺/CD56⁺ 的双阳性细胞比例显著高于同等条件下的 CIK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组患者细胞免疫表型差异结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ /CD56 ⁺
观察组	42	79.21 \pm 4.27*	18.98 \pm 3.62*	50.43 \pm 4.82*	38.15 \pm 4.13*
对照组	42	71.45 \pm 4.11	23.32 \pm 3.51	39.35 \pm 5.11	29.63 \pm 3.98
t		8.485	5.578	10.222	9.627
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 2 组患者细胞分泌因子结果比较 DC-CIK 细胞的分泌因子水平显著高于同等条件下的 CIK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 2 组患者细胞分泌因子结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	IFN- γ (ng/L)	IL-12(ng/L)	TNF- α (ng/L)
观察组	42	482.18 \pm 98.89*	37.67 \pm 5.01*	169.43 \pm 24.82*
对照组	42	348.77 \pm 74.42	19.75 \pm 3.64	71.23 \pm 15.22
t		6.985	18.753	21.858
P		0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

非霍奇金淋巴瘤是一种在我国较为常见的肿瘤,其在常见恶性肿瘤发病率中排前 10 位,是具有很强异质性独立疾病的总称^[4]。非霍奇金淋巴瘤的病变主要发生部位为淋巴结、胸腺、脾脏等淋巴器官,其也可能发生在淋巴结外的淋巴组织器官及淋巴造血系统^[5]。根据细胞来源不同,可将非霍奇金淋巴瘤分为 3 个基本类型:T 细胞、B 细胞、NK/T 细胞,目前临床大多数非霍奇金淋巴瘤患者为 B 细胞型,约占总数的 80%^[6]。非霍奇金淋巴瘤的发病机制目前尚不明确,但可以肯定的是由多种因素共同决定,大致可分为:免疫功能异常、病毒感染、细菌感染、遗传因素等几个方面^[7-8]。虽然非霍奇金淋巴瘤是一种个体化分层比较复杂的肿瘤,但其具有高度治愈的可能性。因此非霍奇金淋巴瘤有效的治疗方法,对患者至关重要。

本研究探讨 DC-CIK 在非霍奇金淋巴瘤的应用效果,结果表明,DC-CIK 的应用效果显著优于对照组,观察组患者细胞的增殖速率显著高于对照组,随培养时间的增加,DC-CIK 细胞 CD3⁺/CD8⁺、CD3⁺/CD56⁺ 的双阳性细胞的比例显著高于同等条件下的 CIK 细胞,且 DC-CIK 细胞的分泌因子水平显著高于同等条件下的 CIK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 Oshiro 等^[9]的报道大致相符,提示 DC-CIK 治疗非霍奇金淋巴瘤有十分显著的疗效。可能与这 2 种细胞的特性有关:CIK 细胞是一种能够对多种肿瘤细胞造成杀伤的细胞毒性 T 淋巴细胞,其不仅拥有 T 淋巴细胞的抗癌活性,还兼具 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤的特性。其杀瘤的机制可大致分为识别和杀伤。由于 CIK 细胞对肿瘤的杀伤具有非 MHC 限制性,细胞毒活性能够被抗淋巴细胞功能相关抗体所阻滞,提示上述因子在 CIK 细胞识别癌症及肿瘤过程中起重要作用^[10-11]。当成功识别肿瘤细胞后,CIK 细胞除了表面的 CD3⁺及 CD56⁺ 产生最大的释放量对肿瘤造成杀伤外,还会通过释放 FasL 蛋白诱导细胞凋亡。而 DC 细胞则是目前所知的抗原递呈功能最强的抗原递呈细胞,其能有效地对幼稚 T 细胞造成刺激,达到活化和诱导特异性抗原免疫反应发生的目的。因此,通过 CIK 与 DC 细胞的共同培养,能显著提高 CIK 细胞的增殖速率。有研究报道,培养 15 d,DC-CIK 细胞增殖到原始数目的 60 倍^[12]。而 CIK 细胞仅增殖到原始数目的 40 倍,DC-CIK 细胞则能扩增至 60 倍。此外,在同一靶下,DC-CIK 细胞的细胞杀伤活性显著高于 CIK 细胞,有效地提高了细胞的抗肿瘤活性。此外,与 DC 细胞共同培养的 CIK 细胞,除了 CD3⁺/CD8⁺ 及 CD3⁺/CD56⁺,均显著高于同等条件下培养的 CIK 细胞外,其还促进了 IL-12、TNF- α 等因子的分泌,保持了 CIK 细胞的活性,因此观察组的效果显著优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

负载自身抗原的 DC-CIK 细胞具有特异性杀伤淋巴瘤细胞的能力,这是 DC-CIK 治疗淋巴瘤的优点;有关 DC-CIK 治疗非霍奇金淋巴瘤的研究较少,因此本研究具有一定的新颖性。综上所述,DC-CIK 细胞治疗非霍奇金淋巴瘤具有明显的临床效果,值得进一步深入研究。

参考文献

[1] 刘小兰,关涛,苏丽萍. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养抗非霍奇金淋巴瘤作用研究[J]. 白血病·(上接第 496 页)

准确性及其漏诊宫颈癌的相关因素分析[J]. 中国计划生育学杂志,2014,22(8):544-546.

[5] Kalliala I, Anttila A, Nieminen P, et al. Pregnancy incidence and outcome before and after cervical intraepithelial neoplasia: a retrospective cohort study[J]. Cancer Med, 2014,3(6):1512-1516.

[6] Singla S, Mathur S, Kriplani A, et al. Single visit approach for management of cervical intraepithelial neoplasia by visual inspection & loop electrosurgical excision procedure[J]. Indian J Med Res, 2012,135(5):614-620.

[7] 李勤凤,余法亮. 阴道镜下多点活检联合宫颈管搔刮与 LEEP 术在 CIN 诊治中的应用分析[J]. 中国妇幼保健, 2015,30(20):3506-3508.

淋巴瘤,2013,22(8):466-469.

[2] 孙意,陈健,蔡鹏,等. 用抗原特异性树突状细胞激活的淋巴细胞治疗复发难治性非霍奇金淋巴瘤[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(1):219-223.

[3] 脱帅,张宁芬,张宁,等. 树突细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞对原发性肝脏淋巴瘤生长和术后复发转移的抑制作用[J]. 解放军医学杂志,2010,35(12):1449-1454.

[4] 齐雪军,赵亚玲,付建珠,等. 非霍奇金淋巴瘤中 PTEN、VEGF 表达水平及微血管密度的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2015,21(3):223-227.

[5] 曹欣欣,李剑,张薇,等. 培门冬酶联合化疗治疗急性淋巴细胞白血病与 T 细胞非霍奇金淋巴瘤的安全性分析[J]. 中华血液学杂志,2015,36(3):177-180.

[6] 王兴,孟箭.¹²⁵I 粒子植入治疗高龄非霍奇金淋巴瘤并吞咽困难一例[J]. 中华全科医师杂志,2015,14(5):388-389.

[7] 王聪,袁长吉,何华,等. 151 例原发性非霍奇金淋巴瘤的临床病理特点及预后因素分析[J]. 中华肿瘤杂志,2014, 36(11):858-862.

[8] 汪洋,李志鹏,叶春伟,等. 非霍奇金淋巴瘤合并原发性肾细胞癌一例报告[J]. 中华泌尿外科杂志,2015,14(6): 457-457.

[9] Oshiro K, Kohama H, Umemura MA, et al. Interleukin-17a is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine[J]. Immunobiology, 2012, 217(1): 54-60.

[10] 张燕萍,周晓慧,张丽,等. 利妥昔单抗联合改良 CHOP 方案治疗非霍奇金淋巴瘤的临床疗效及安全性评价[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(12):1109-1111.

[11] Roberson PL, Amro H, Wilderman SJ, et al. Bio-effect model applied to I-131 radioimmunotherapy of refractory non-Hodgkin's lymphoma[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011,38(5):874-883.

[12] 陈曦,王欢,张勇,等. 老年非霍奇金淋巴瘤个体化分组治疗的疗效[J]. 中国老年学杂志,2015,35(11):3018-3019.

(收稿日期:2016-09-06 修回日期:2016-11-12)

[8] Kang WD, Choi HS, Kim SM. Is vaccination with quadrivalent HPV vaccine after loop electrosurgical excision procedure effective in preventing recurrence in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia(CIN2-3)[J]. Gynecol Oncol, 2013,130(2):264-268.

[9] 杨凤云,杨波,顾萍,等. 阴道镜下宫颈活检和宫颈电环切术后病理检查对宫颈病变的诊断价值[J]. 上海交通大学学报(医学版),2012,32(4):495-498.

[10] 孙成玲,周荣向,秦妮妮,等. 阴道镜下多点活检联合 LEEP 术诊治宫颈上皮内瘤变的临床效果[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(7):70-71.

(收稿日期:2016-09-28 修回日期:2016-12-04)