

高强度聚焦超声治疗胰腺癌的免疫机制研究

钟国成 张聪 陈健 张小玉 孙慧 桂永忠 李硕 匡红

【摘要】 目的 探讨高强度聚焦超声(HIFU)治疗胰腺癌的免疫学效应。方法 选择30例诊断明确并接受HIFU治疗的胰腺癌患者,分离获得患者的自体癌细胞、树突状细胞(DC)和T淋巴细胞,对癌细胞抗原分别进行冻融(Ag1)和HIFU处理(Ag2)处理,比较两种抗原所诱导的DC-T对自身癌细胞的杀伤效应;同时记录患者HIFU治疗前后多种免疫学和临床疗效指标。结果 Ag2致敏的DC-T对癌细胞的杀伤率 $[(48.13 \pm 14.35)\%]$ 明显高于Ag1 $[(39.74 \pm 8.78)\%]$;HIFU治疗后,患者的免疫学指标[淋巴细胞核仁区嗜银蛋白比值: 4.65 ± 1.32 vs. 4.17 ± 0.84 ;CD56阳性率: $(4.34 \pm 0.94)\%$ vs. $(3.92 \pm 0.79)\%$;CD4/CD8: 1.17 ± 0.56 vs. 0.95 ± 0.43 ;IL-12: (61.72 ± 18.83) pg/ml vs. (52.34 ± 13.27) pg/ml;热休克蛋白70: (23.62 ± 5.93) ng/ml vs. (18.28 ± 4.27) ng/ml;TGF- β : (0.84 ± 0.37) ng/ml vs. (1.42 ± 0.54) ng/ml]、生活质量评分 $(2.19 \pm 0.92$ vs. $2.63 \pm 1.07)$ 、疼痛评分 $(2.86 \pm 1.04$ vs. $4.23 \pm 1.76)$ 、肿瘤标志物[CA199: (117.55 ± 31.89) U/ml vs. (146.73 ± 37.46) U/ml;CA242: (86.82 ± 22.53) U/ml vs. (105.97 ± 30.62) U/ml]等均优于治疗前(P 均 <0.05)。结论 癌细胞抗原经HIFU处理后能增强DC-T对自身癌细胞的杀伤率;HIFU能有效治疗胰腺癌,同时能改善患者免疫状态,增强患者的抗肿瘤应答。

【关键词】 胰腺肿瘤; 超声,高强度聚焦,经肠; 免疫,细胞; 树突细胞; 抗原,肿瘤

Clinical research on immune mechanism of high intensity focused ultrasound for the treatment of pancreatic cancer ZHONG Guo-cheng, ZHANG Cong, CHEN Jian, ZHANG Xiao-yu, SUN Yi, GUI Yong-zhong, LI Shuo, KUANG Hong. Department of Oncology, 452nd Hospital of PLA, Chengdu 610021, China

Corresponding author: CHEN Jian, Email: zgc005@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To discuss the immunologic effect of high intensity focused ultrasound (HIFU) on patient with pancreatic cancer. **Methods** 30 patients with pancreatic cancer were treated by HIFU. Autogenous tumor cells, dendritic cells (DC), T lymphocytes of these patients were isolated and cultured. Then, autogenous tumor antigen was processed by freeze-thaw (Ag1) or by HIFU (Ag2), the killing activity of DC-T which loaded Ag1 or Ag2 on autogenous tumor cells was observed. At the same time, a variety of immunological and clinical efficacy parameters of patients before and after treatment of HIFU were compared. **Results** The killing activity of Ag2-DC-T was significantly higher than that of Ag1-DC-T; After treatment of HIFU, the immunological parameters [AgNOR: 4.65 ± 1.32 vs. 4.17 ± 0.84 ; CD56: $(4.34 \pm 0.94)\%$ vs. $(3.92 \pm 0.79)\%$; CD4/CD8: 1.17 ± 0.56 vs. 0.95 ± 0.43 ; IL-12: (61.72 ± 18.83) pg/ml vs. (52.34 ± 13.27) pg/ml; Hsp70: (23.62 ± 5.93) ng/ml vs. (18.28 ± 4.27) ng/ml; TGF- β : (0.84 ± 0.37) ng/ml vs. (1.42 ± 0.54) ng/ml], quality of life $(2.19 \pm 0.92$ vs. $2.63 \pm 1.07)$, score of pain $(2.86 \pm 1.04$ vs. $4.23 \pm 1.76)$ and tumor marks [CA199: (117.55 ± 31.89) U/ml vs. (146.73 ± 37.46) U/ml; CA242: (86.82 ± 22.53) U/ml vs. (105.97 ± 30.62) U/ml] of patients were better than that of before treatment (all $P < 0.05$). **Conclusions** Tumor antigen processed by HIFU can improve the killing activity of DC-T on autogenous tumor cells; HIFU can be effective in the treatment of pancreatic cancer, furthermore, it can improve the immunologic status and anti-tumor response of patients.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Ultrasound, high-intensity focused, transrectal; Immunity, cellular; Dendritic cells; Antigens, neoplasm

胰腺癌(pancreatic cancer)恶性程度高,病情进展

迅猛,预后差,生存时间短,是目前临床难以有效治疗的消化道肿瘤。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)是一种超声波治疗肿瘤的非创技术,其基本原理是将超声波透过软组织并在计算机控制下精确汇聚于体内实体肿瘤中心,产生70~90℃以上高温及多种物化效应使肿瘤组织发生凝固性坏死^[1]。与

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.14.021

基金项目:四川省卫生厅科学研究项目(060015)

作者单位:610021 成都,解放军第452医院肿瘤科(钟国成、张聪、陈健、孙慧、桂永忠、李硕、匡红),核医学科(张小玉)

通讯作者:陈健,Email:zgc005@yahoo.com.cn

放化疗相比,HIFU 机体损伤小,不良反应轻,肿瘤特异性杀伤高,对胰腺癌具有良好的治疗价值。随着 HIFU 技术的不断应用,其在治疗过程中所产生的免疫效应也越来越受到学者关注^[2]。本中心自 2010 年起选择 30 例接受 HIFU 治疗的胰腺癌患者作为研究对象,分析患者在 HIFU 治疗前后的免疫功能,并经体外细胞实验验证。现将研究结果报道如下,旨在探讨 HIFU 治疗胰腺癌过程中参与的免疫机制。

资料与方法

一、一般资料

2010 年 2 月至 2011 年 8 月选择 30 例在我院确诊为胰腺癌的患者进行研究。男 17 例,女 13 例,年龄 32~71 岁,中位年龄 58.5 岁。按照国际抗癌联盟(UICC)临床分期:Ⅱ期 3 例,Ⅲ期 13 例,Ⅳ期 14 例。患者中胰头癌 16 例,胰体、尾癌 14 例。所选患者之前均未行手术及放化疗(无适应证或主观拒绝),满足 HIFU 治疗适应证并愿意接受 HIFU 治疗。所有患者或法定代理人在《知情同意书》和《治疗同意书》上签字。

二、试剂和仪器

JC 型高强度聚焦超声肿瘤治疗系统购自重庆海扶(HIFU)有限公司(设备参数:频率 0.8 MHz,焦距 135 mm,声功率 180~350 W,焦域声强 5328~16 285 W/cm)。细胞杀伤乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自 Roche 公司;FITC 标记的抗人 CD3、CD4 单克隆抗体,PE 标记的抗 CD8、CD56 单抗,重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)、IFN- γ 、IL-1、IL-2、1640 培养液购自 BD 公司;IL-12、TGF- β 和热休克蛋白 70(Hsp70)定量 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司;抗人 CD3 单克隆磁珠抗体购自 Miltenyi 公司;KL 型肿瘤免疫图像分析系统购自北京健尔康公司。人胚胰腺组织来源细胞株 CCC-HPE-2(简称为 HPE-2)由第三军医大学全军肿瘤研究所惠赠。

三、体外细胞实验

1. 癌细胞和肿瘤抗原的制备:取得患者同意,CT 定位下经皮胰腺组织穿刺活检或经十二指肠镜逆行胰胆管活检获得少量新鲜癌组织,用含双抗的生理盐水反复洗涤并研磨成匀浆,加入 200 U/ml 胶原酶 IV 消化成悬液,过 400 目筛孔后经淋巴细胞液分离获得自体癌细胞并行原代培养^[3]。癌细胞扩增后分成 3 组:第 1 组用于制备冻融抗原(Ag1),将自体癌细胞在 -80℃ 液氮中冷冻 30 min,再迅速复温至 37℃ 放置 30 min,反复冻融 3 次后,离心,收集上清并通过 0.22 μ m 微孔膜过滤除菌,再用紫外荧光计定量后作为 Ag1 备用;第 2

组用于制备 HIFU 抗原(Ag2),将自体癌细胞装入聚乙烯试管,固定于 HIFU 治疗系统,开启 HIFU 系统汇焦点于细胞悬液中心,应用 1000 W/cm² 参数对癌细胞进行 HIFU 超声破碎(共破碎 3 次,45 s/次,间隔 30 s),破碎后离心,收集上清,除菌,定量(方法同 Ag1)后作为 Ag2 备用;第 3 组癌细胞作为杀伤靶细胞备用。

2. 树突状细胞(DC)和 T 细胞的诱导:参考文献^[4-5]分离患者的外周血单个核细胞[PBMC,(5~10) \times 10¹⁰,纯度 \geq 95%],贴壁 2 h,吸去悬浮细胞,在贴壁细胞(CD14⁺ 单核细胞)中加入 GM-CSF 和 IL-4 以诱导 DC;将收集的悬浮细胞通过抗 CD3 单克隆磁珠抗体,阳性分选纯化 T 细胞,并加入含有 IL-2(终浓度 5 ng/ml)的 1640 液培养。诱导第 6 天,将 DC 分为 3 组:第 1 组,单纯 DC;第 2 组,在 DC 中加入终浓度为 5 μ g/ml 的 Ag1 致敏(Ag1-DC);第 3 组,在 DC 中加入终浓度为 5 μ g/ml 的 Ag2(Ag2-DC)。继续培养 3 组细胞,于诱导第 7 天,将 3 组 DC 分别与 T 细胞按 1:10 混合培养 24 h,作为细胞毒效应细胞备用。

3. 细胞毒实验:分别以 DC-T、Ag1-DC-T 和 Ag2-DC-T 为效应细胞(密度为 1 \times 10⁶ 个/ml);以正常人胚胰细胞 HPE-2 和自体癌细胞为靶细胞(密度 1 \times 10⁵ 个/ml)。将各组效应细胞与靶细胞按 10:1 加入 96 孔板中并在 37℃ 孵箱中培养 6 h(每孔中效应细胞与靶细胞各 100 μ l,设 3 个复孔^[5])。应用 LDH 试剂盒(按说明书)检测各组效应细胞对不同靶细胞的杀伤率。并用 ELISA 试剂盒检测自体癌细胞上清 IFN- γ 的含量。共重复 3 次。

四、HIFU 治疗

治疗前完善血常规、凝血等相关检查,嘱患者 HIFU 前 12 h 禁饮食,并口服少量缓泻剂。治疗时患者平卧于 HIFU 系统并固定体位,由机载计算机超声监控装置再次明确拟治疗的肿瘤灶的数目、解剖位置、治疗层面数和范围。启动系统,选择适宜的治疗参数,在超声实时定位和监控下破坏肿瘤病灶(依层面顺序由线到面完全适形覆盖预定的三维靶区)。治疗过程中各层面治疗前后靶区声像图和组织回声变化实时反馈至计算机系统进行治疗评估并对超声强度进行调整。根据肿瘤大小和患者的耐受情况调整治疗功率和时间(一般不超过 1 h^[6]),部分患者接受 2 次以上 HIFU 治疗(两次治疗之间需休息 1 周以上)。

五、检测方法

1. 免疫功能测定:分别于 HIFU 前与 HIFU 治疗后 96 h 分离患者的 PBMC,加入相应的荧光抗体,通过流式细胞仪检测患者外周血淋巴细胞 CD56⁺ (NK 细胞)阳性

表2 患者治疗前后免疫学指标($n=30, \bar{x} \pm s$)

时间	AgNOR (IS%)	CD56 (%)	CD4/CD8	IL-12 (pg/ml)	Hsp70 (ng/ml)	TGF- β (ng/ml)
HIFU 前	4.17 \pm 0.84	3.92 \pm 0.79	0.95 \pm 0.43	52.34 \pm 13.27	18.28 \pm 4.27	1.42 \pm 0.54
HIFU 后	4.65 \pm 1.32 ^a	4.34 \pm 0.94 ^a	1.17 \pm 0.56 ^a	61.72 \pm 18.83 ^a	23.62 \pm 5.93 ^a	0.84 \pm 0.37 ^a

注:与 HIFU 前比较,^a $P < 0.05$

率、CD4⁺/CD8⁺ 比值;将 PBMC 银染,通过 KL 免疫图像分析系统,计算淋巴细胞核仁区嗜银蛋白 (Ag-NORs) 面积与核面积的比值 (IS%);在相同时间收集患者血清,用定量 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-12、TGF- β 及 Hsp70 含量(根据试剂盒样品的标准曲线计算)。

2. 疼痛、生活质量评分和肿瘤标志物:分别于 HIFU 前和治疗后 3 周记录患者的癌症疼痛视觉模拟评分 (visual analogue scale, VAS)、生活质量(体力状况 PS 评分, performance status, 分值越低生活质量越好)和外周血清肿瘤标志物糖类抗原 (CA) 199、CA242 的含量。

3. 不良反应监测:定期监测患者血常规、肝肾功能。不良反应按美国国立癌症研究所 CTCAE 3.0 版记录。

六、统计学分析

汇总各项数据,应用 SAS 8.0 医用统计软件包分析。采用 q 检验和 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 细胞实验(表 1):经检测,Ag2-DC-T 与 Ag1-DC-T 对自体癌细胞的杀伤率均高于 DC-T ($P < 0.05$),而 Ag2-DC-T 的杀伤率较 Ag1-DC-T 更高 ($P < 0.05$);与之一致,自体癌细胞上清中 Ag2-DC-T 分泌的 IFN- γ 最高 ($P < 0.05$);3 组效应细胞对 HPE-2 均未显示明显杀伤作用 ($P > 0.05$)。

表1 细胞杀伤试验($\bar{x} \pm s$)

效应细胞	例数	对 HPE-2 杀伤 (%)	对自体癌细胞 杀伤 (%)	自体癌细胞上清 IFN- γ (pg/ml)
DC-T	30	9.01 \pm 2.82	26.46 \pm 7.19	31.56 \pm 10.14
Ag1-DC-T	30	8.89 \pm 2.74	39.74 \pm 8.78 ^a	40.12 \pm 10.79 ^a
Ag2-DC-T	30	8.94 \pm 3.05	48.13 \pm 14.35 ^{ab}	46.63 \pm 12.82 ^{ab}

注:多样本均数比较 q 检验:^a:与 DC-T 比较, $q \geq 4.3506, P < 0.01$; ^b:与 Ag1-DC-T 比较, $q \geq 3.1533, P < 0.05$

2. 免疫学指标(表 2):HIFU 治疗后 96 h,患者外周血淋巴细胞 AgNOR 比值、CD3CD56 阳性率、血清 IL-12、Hsp70 均比治疗前增加 ($P < 0.05$)。血清 TGF- β 较治疗前降低 ($P < 0.05$)。

3. 临床疗效(表 3):HIFU 治疗后 3 周,患者 PS 评分、VAS 评分、血清 CA199、CA242 等指标均较治疗前

改善 ($P < 0.05$)。

表3 两组患者治疗前后 PS 评分、VAS 评分及肿瘤标志物($n=30, \bar{x} \pm s$)

时间	PS 评分	VAS 评分	CA199 (U/ml)	CA242 (U/ml)
HIFU 前	2.63 \pm 1.07	4.23 \pm 1.76	146.73 \pm 37.46	105.97 \pm 30.62
HIFU 治疗 3 周后	2.19 \pm 0.92 ^a	2.86 \pm 1.04 ^a	117.55 \pm 31.89 ^a	86.82 \pm 22.53 ^a

注:与 HIFU 前比较,^a $P < 0.05$

4. 不良反应:治疗过程中患者未出现穿孔、出血、腹膜炎或胰液渗漏等并发症。主要毒性反应为轻度恶心、呕吐,一过性发热,给予对症处理后症状缓解。有 7 例患者出现皮肤水疱,局部换药后愈合。

讨 论

HIFU 是一种通过热消融治疗实体肿瘤的新型技术,它可将体外低能量超声波聚焦于体内深部肿瘤病灶,在焦点区域产生多种效应实现对肿瘤组织的形变破坏,而对正常组织几无影响。其治疗机制包括:(1)高温效应,焦点区域可达到 60~100 $^{\circ}\text{C}$;(2)空化效应,通过空化微泡产生高温高压;(3)机械效应,HIFU 可使肿瘤组织反复高速振荡,降解 DNA;(4)破坏肿瘤滋养血管,阻碍肿瘤血供,产生继发性损伤^[7]。基于这些特性,HIFU 正成为胰腺癌的一种新型治疗手段。随着研究的深入,人们发现除了对肿瘤产生以上 4 种杀伤效应外,HIFU 还会对机体产生正向的免疫调节作用^[8]。本文的研究目的就是探讨 HIFU 治疗胰腺癌过程中对患者肿瘤免疫的影响及其作用机制。

在细胞实验中,我们分别用冻融抗原、HIFU 抗原致敏 DC,并诱导相应 T 细胞杀伤,结果 HIFU 抗原诱导的 T 细胞对癌细胞的杀伤率 [(48.13 \pm 14.35)%] 明显高于冻融抗原 [(39.74 \pm 8.78)%],同时产生的 IFN- γ [(46.63 \pm 12.82) pg/ml] 也高于冻融抗原 [(40.12 \pm 10.79) pg/ml]。分析其机制,可能是较之冻融抗原,HIFU 的机械性及化学性破坏作用能使隐藏于细胞膜、细胞质和细胞核内的肿瘤抗原表位得到充分暴露和释放,产生肿瘤全细胞裂解抗原,免疫原性和刺激信号增强,促进 DC 的成熟和对抗原的呈递,进而诱导出针对肿瘤具有高杀伤活性的细胞毒 T 细胞^[9];作为对照,不同抗原致敏的 DC-T 对不含肿瘤表位的 HPE-2 均未显

示出特异性杀伤效应。

为了分析 HIFU 的免疫效应,我们选择以下指标进行检测:(1) Hsp70,与抗原诱发免疫应答的能力一致;(2) CD4/CD8 比值,在一定程度上反映特异性细胞免疫强弱;(3) CD56, NK 细胞表面标志,与 NK 等非特异免疫细胞的活性正相关;(4) IL-12,典型的 Th1 型因子,可以反映体内 Th1/Th2 平衡;(5) AgNOR, rDNA 转录调节蛋白,可体现 T 细胞转录活性和机体免疫状态^[10];(6) TGF- β ,免疫抑制因子。HIFU 治疗后,患者前五项指标 [分别为 (23.62 \pm 5.93) ng/ml; 1.17 \pm 0.56; (4.34 \pm 0.94) %; (61.72 \pm 18.83) pg/ml; 4.65 \pm 1.32] 均较治疗前 [分别为 (18.28 \pm 4.27) ng/ml; 0.95 \pm 0.43; (3.92 \pm 0.79) %; (52.34 \pm 13.27) pg/ml; 4.17 \pm 0.84] 增加,说明 HIFU 能促进肿瘤组织合成 Hsp70,释放“危险信号”,同时刺激特异性 T 细胞和非特异免疫细胞 NK 的活性,有助于改善胰腺癌患者体内 Th1 向 Th2 应答漂移的趋势;而 TGF- β 在 HIFU 治疗后明显下降 [治疗前 (1.42 \pm 0.54) ng/ml,治疗后 (0.84 \pm 0.37) ng/ml],则提示 HIFU 通过破坏肿瘤组织,大大减轻了肿瘤的免疫抑制,并且因为减轻瘤负荷为免疫治疗提供了有利的体内环境^[11]。综合这些免疫指标可以看出,HIFU 对于抑制肿瘤免疫逃逸、打破免疫封闭,激活机体抗肿瘤应答确实具有一定作用。

HIFU 治疗后,多数患者短期内肿瘤标志物水平降低 [CA199: (146.73 \pm 37.46) U/ml vs. (117.55 \pm 31.89) U/ml; CA242: (105.97 \pm 30.62) U/ml vs. (86.82 \pm 22.53) U/ml],生活质量提高 (PS 评分: 2.63 \pm 1.07 vs. 2.19 \pm 0.92),疼痛减轻 (VAS 评分: 4.23 \pm 1.76 vs. 2.86 \pm 1.04),显示了较好的临床疗效。结合以上结果我们认为,HIFU 对于胰腺癌不仅是一种有效的局部治疗手段,而且能改善患者免疫状态,刺激抗肿瘤应答,很可能与过继免疫治疗具有良好的协同疗效^[12]。不过,由于胰腺癌患者往往存在严重的免疫功能缺陷,

HIFU 产生的免疫支持作用维持时间较短,很难逆转机体的肿瘤大环境,所以对 HIFU 的治疗机制还需要进一步深入研究和探索。

参 考 文 献

- [1] Sung HY, Jung SE, Cho SH, et al. Long-term outcome of high-intensity focused ultrasound in advanced pancreatic cancer. *Pancreas*, 2011, 40:1080-1086.
- [2] Liu F, Hu Z, Qiu L, et al. Boosting high-intensity focused ultrasound-induced anti-tumor immunity using a sparse-scan strategy that can more effectively promote dendritic cell maturation. *J Transl Med*, 2010, 8:7-17.
- [3] 钟国成,张小玉,孙慧,等. 自体肿瘤抗原致敏的树突状细胞联合细胞因子诱导杀伤细胞应用于胰腺癌治疗的临床研究. *肿瘤*, 2010, 30:395-400.
- [4] Bauer C, Dauer M, Saraj S, et al. Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a pilot study. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60:1097-1107.
- [5] Zhong G, Wang J, Xu M, et al. Enhanced maturation and functional capacity of dendritic cells induced by mannosylated L2 domain of ErbB2 receptor. *Scand J Immunol*, 2005, 62:108-116.
- [6] 钟国成,张小玉,陈健,等. 高强度聚焦超声联合吉西他滨动脉灌注治疗胰腺癌疗效评价. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34:68-72.
- [7] Sofuni A, Moriyasu F, Sano T, et al. The current potential of high-intensity focused ultrasound for pancreatic carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2011, 18:295-303.
- [8] 刘丽霞,叶欣. 高强度聚焦超声治疗与肿瘤免疫. *肿瘤研究与临床*, 2005, 17:140-141.
- [9] Dodson LF, Hawkins WG, Goedegebuure P. Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics. *Immunotherapy*, 2011, 3:517-537.
- [10] 闵敏,张小玉,冯怀志,等. 自身抗原激活的树突状细胞联合细胞因子诱导杀伤细胞过继免疫治疗晚期前列腺癌的临床研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5:5889-5893.
- [11] Deng J, Zhang Y, Feng J, et al. Dendritic cells loaded with ultrasound-ablated tumour induce in vivo specific antitumour immune responses. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36:441-448.
- [12] Jang HJ, Lee JY, Lee DH, et al. Current and Future Clinical Applications of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Pancreatic Cancer. *Gut Liver*, 2010, 4:557-61.

(收稿日期:2012-02-16)

(本文编辑:马超)