

自体树突状细胞疫苗治疗雌、孕激素受体 双阴性乳腺癌的疗效观察

213003 江苏常州 南京医科大学附属常州二院肿瘤内科
闵海燕, 李娟娟¹, 戚春建, 宁永玲, 钱科卿, 刘同强²

【摘要】目的 评价自体肿瘤冻融抗原致敏的自体树突状细胞(ADC)疫苗免疫治疗,对处于Ⅱ、ⅢA期雌、孕激素受体双阴性表达乳腺癌患者的疾病进展及生存情况的影响。**方法** 利用自体肿瘤冻融抗原致敏的CD14⁺前体细胞产生树突状细胞,在细胞因子的作用下开始成熟,制备ADC疫苗。选取符合入组标准的63例患者,根据治疗方案分为实验组和对照组,实验组共接受4次皮下ADC回输。测定实验组疫苗接种前后IFN- γ ⁺/CD8⁺T细胞含量及两组针对抗肿瘤裂解物发生的Ⅳ型变态反应情况,随访两组的疾病进展情况。**结果** 疫苗接种后提高了IFN- γ ⁺/CD8⁺T细胞数量,与疫苗接种前比较差异有统计学意义[(23.4±4.1)% vs. (14.3±2.0)%, $P < 0.05$];实验组18例(58.1%)为Ⅳ型变态反应阳性,而对照组均为阴性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组的3年无进展生存率高于对照组,差异有统计学意义(76.9% vs. 31.0%, $P < 0.05$)。实验组未发生严重不良反应。**结论** ADC疫苗可能通过触发乳腺癌患者的免疫应答机制来治疗乳腺癌,具有较好的效果,并延长无进展生存期。

【关键词】 树突状细胞; 乳腺癌; 免疫治疗

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2013)11-1005-04

Observations on the effect of autologous dendritic cells vaccine on patients with estrogen receptor/progestin receptor double-negative breast cancer

MIN Haiyan, LI Juanjuan, QI Chunjian, NING Yongling, QIAN Keqing, LIU Tongqiang. Department of Oncology, the Affiliated Changzhou NO. 2 Hospital of Nanjing Medical College, Changzhou 213003, China

Corresponding author: LI Juanjuan, E-mail:juanli1106@tom.com

【Abstract】 Objective To evaluate the disease progression and post-treatment survival of autologous dendritic cells (ADC) vaccine on patients with estrogen receptor/progestin receptor double-negative stage Ⅱ/ⅢA breast cancer. **Methods** ADC vaccines were generated from CD14⁺ precursors pulsed with autologous tumor lysates. ADCs were matured with defined factors. Sixty-three patients were divided into the experimental group and control group. The experimental group was immunized intradermally four times. The levels of IFN- γ ⁺/CD8⁺T cells in experimental group before and after vaccination were detected. Type Ⅳ allergic reaction against the tumor lysate of both groups was measured. Disease progression rates were analyzed. **Results** The level of IFN- γ ⁺/CD8⁺T cells increased after vaccination, higher than that before vaccination (23.4±4.1% vs. 14.3±2.0%, $P < 0.05$). Eighteen patients in experimental group had positive type Ⅳ allergic reactions, while all patients in control group were negative ($P < 0.05$). The 3-year progression-free rate of experimental group was higher than that of control group (76.9% vs. 31.0%, $P < 0.05$). There were no unanticipated or serious adverse effects. **Conclusion** ADC vaccine might treat breast cancer by triggering immune responses of patients.

【Key Words】 Dendritic cells; Breast cancer; Immunotherapy

雌、孕激素受体双阴性表达的乳腺癌患者的预后较差,主要原因是这类肿瘤的侵袭性生物学行为及内分泌治疗效果不理想,在某些病例中甚至标准

化疗方案也对其无疗效,需要探索新的治疗方法。树突状细胞(dendritic cells, DC)是一种强效的抗原呈递细胞,其作为抗肿瘤疫苗的组成部分,已得到

1 通讯作者, E-mail:juanli1106@tom.com

2 213003 南京医科大学附属常州二院肾内科

广泛研究^[1]。目前尚无制备 DC 免疫疫苗的标准方法, 主要问题仍围绕如何获得充足的、特定类型的抗原及成熟阶段的 DC。由于高亲和力多肽诱导产生耐受性感应的原因为, 肿瘤通过单克隆增殖产生缺少抗原表型, 或缺乏免疫学相关的该抗原信号通道的个体细胞可逃过免疫追杀, 因而利用人工合成多肽作为抗原的临床试验未能达到临床治疗目标, 也未能够提高患者生存期^[2-3]。与此相反, DC 混合或被转染肿瘤细胞抗原, 或暴露于肿瘤冻融抗原环境中, 可表现出强烈而广泛地诱导抗肿瘤细胞免疫应答的特性^[4]。目前有关 DC 治疗雌、孕激素双阴性 II、III A 期乳腺癌的疗效不清楚。本研究对雌、孕激素双阴性 II、III A 期乳腺癌进行自体树突状细胞 (autologous dendritic cells, ADC) 疫苗回输, 评价其疗效和不良反应, 为今后的研究提供参考, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取南京医科大学附属常州二院 2008 年 3 月至 2009 年 2 月收治的 63 例乳腺癌患者, 入组标准: (1) 年龄范围 20 ~ 75 岁; (2) 病理确诊的雌、孕激素受体双阴性表达; (3) 临床分期为 II、III A 期; (4) 曾接受手术切除; (5) 接受过常规放疗化疗等综合治疗, 化疗方案为 CAF、CMF、PC (PTX + CTX)、ADM + TXT、AC (ADM + CTX); (6) 经胸腹部 CT、ECT、MRI、肿瘤指标、肝肾功能等评估处在稳定期的患者。根据治疗方法将患者分为对照组 (仅接受常规治疗) 和实验组 (接受 ADC 疫苗治疗), 两组的年龄、肿瘤病理类型、分期、治疗方案等差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验组 31 例, 年龄范围 36 ~ 74 岁, 平均 (54.1 ± 9.6) 岁; 浸润性导管癌 28 例, 浸润性小叶癌 1 例, 髓样癌 1 例, 粘液性腺癌 1 例; HER-2 状态: (-) 者 10 例, (+) ~ (+++) 者 21 例; Ki-67 状态: ≥30% 者 18 例, <30% 者 13 例; 肿瘤分期: II 期 19 例, III A 期 12 例。对照组 32 例, 年龄范围 34 ~ 72 岁, 平均 (54.5 ± 10.4) 岁; 浸润性导管癌 28 例, 浸润性小叶癌 1 例, 髓样癌 3 例; HER-2 状态: (-) 者 14 例, (+) ~ (+++) 者 18 例; Ki-67 状态: ≥30% 者 17 例, <30% 者 15 例; 肿瘤分期: II 期 20 例, III A 期 12 例。该研究经本院伦理委员会批准, 所有受试者均签订了知情同意书。

1.2 ADC 疫苗的制备

1.2.1 抗原来源及制备 采用自体肿瘤组织作为

肿瘤排斥抗原的来源。在手术过程中收集切下的肿瘤组织 (1 ~ 2 cm³), 切成体积小于 1 mm³ 的碎块, 然后将这些碎块放于装有 5 ml 酶溶液 (0.1 mg/ml 胶原酶, 1 mg/ml 脱氧核苷酸酶, 及 1 mg/ml 透明质酸酶) 的离心管中, 37°C 30 min。利用不锈钢过滤筛 (200 目) 过滤可得到细胞悬液, 冲洗, 得到单细胞悬液。在 42°C 下, 放到细胞裂解试剂中进行细胞裂解 3 h, 再经过 5 个冷冻/解冻循环 (-80°C 和 37°C), 细胞裂解物制备完成。经台盼蓝染色法证明无存活细胞残余, 剩下的悬液置于 -80°C 下保存待用。

1.2.2 ADC 的制备及致敏 利用血细胞分离机 (Fresenius, St. Wendel, Germany) 分离白细胞, 流式细胞仪分离出单核细胞, 利用商用磁珠分离仪 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 提取 CD14⁺ 细胞, 随后将其培养在 GT-T551 细胞培养基中, 并向该培养基内加入 0.5% 人类血清蛋白, 2 nmol/L 谷氨酸盐, 100 μmol/L 非必需氨基酸, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 20 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液。细胞培养中增加 20 ng/ml 粒细胞刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 与 20 ng/ml 白介素 (Interleukin, IL)-4。在细胞培养的第 2、5 天添加其额外的细胞因子。在细胞培养的第 5 天加入肿瘤抗原 (见方法 1.2.1)。细胞培养第 5 天, 提取未成熟的 ADC 并在培养基中加入 GM-CSF 及 IL-4 重新悬浮。将肿瘤冻融抗原与 ADC 按照 1:3 至 1:10 的比例 (该比例取决于肿瘤细胞的数量) 混合。细胞培养第 6 天, 向细胞培养基中加入 10 ng/ml IL-1β、10 μg/ml 前列腺素 (Prostaglandin, PG) E2 和 20 ng/ml 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-α。细胞培养第 7 天, 从培养基中分离载有抗原的 ADC, 并且重新悬浮于含有 0.5% 人类血清的 2 ml 生理盐水中准备立即注射到患者体内。在细胞移植的当天, 将终产物的样本进行微生物检查, 证实均为无菌。

1.2.3 ADC 疫苗回输 实验开始给予第 1 次 ADC 疫苗免疫, 以后每 2 周 1 次, 共回输 4 次, 取双侧腹股沟皮下注射疫苗, 每次注射 ADC 数量为 1×10^7 个。观察注射 ADC 疫苗后的不良反应。

1.3 特异性抗肿瘤免疫反应检测

1.3.1 肿瘤抗原反应性 CD8⁺ T 细胞 (IFN-γ⁺/CD8⁺) 含量的检测 在患者接受免疫治疗前及免疫治疗后 1 周采集外周血 5 ml, 经密度梯度离心获得 2×10^6 外周血单核细胞, 使用 10:1 比例的肿瘤裂

解物刺激以上单核细胞 3~4 天,在最后 4~5h 加入 10 μ g/ml 蓝菌素。冲洗,在 PerCP-CD8 存在的情况下共同培养,以便细胞外染色。冲洗细胞,利用 4% 的甲醛固定 15min,加入透化作用溶液 10min。将细胞在含有 FITC-IFN- γ 溶液中培养 30min,冲洗两次,利用流式细胞仪进行分析。

1.3.2 IV 型变态反应(迟发型)的检测 末次治疗后 1 个月,测定两组患者体内的针对抗肿瘤裂解物发生的 IV 型变态反应。前臂皮下注射含有密度为 $0.5 \times 10^6/0.1$ ml 肿瘤裂解物的生理盐水测定 IV 型变态反应。注射 48~72h 时后,通过测量注射部位红斑和硬结的直径评价 IV 型变态反应的强度,直径 >5mm 为免疫应答阳性。

1.4 临床评估 主治医师随诊,内容包括常规病史、体格检查和胸片,治疗后每隔一段时间行 CT 检查或记录肿瘤复发的症状与体征,截止于 2012 年 12 月随访患者的 3 年无进展生存率。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 13.0 版软件处理。采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抗肿瘤免疫反应的检测

2.1.1 免疫接种前后的 IFN- γ^+ /CD8 $^+$ T 细胞含量 实验组最后一次接种 ADC 后的 IFN- γ^+ /CD8 $^+$ T 细胞含量为 $(23.4 \pm 4.1)\%$,高于接种前的 $(14.3 \pm 2.0)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

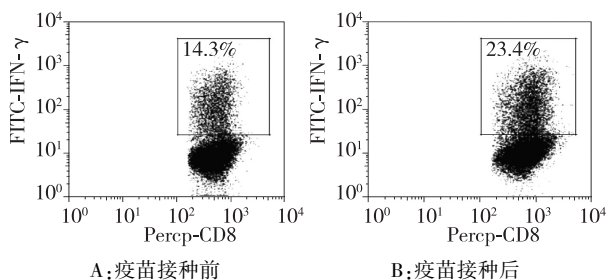
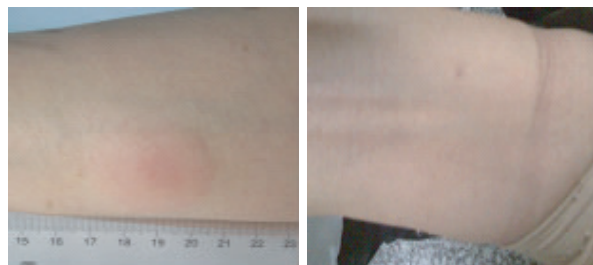


图 1 实验组疫苗接种前后 IFN- γ^+ /CD8 $^+$ T 细胞含量分析

2.1.2 IV 型变态反应(迟发型)的检测情况 实验组 18 例(58.1%)患者出现 IV 型变态反应,直径 ≥ 5 mm 确定为免疫应答阳性,对照组均为免疫应答阴性,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 两组 3 年无进展生存期比较 所有患者的最



A: 实验组 B: 对照组

图 2 两组 IV 型变态反应(迟发型)的检测

短随访时间为 36 个月。实验组的 3 年无进展生存率为 77.4%,对照组为 31.0%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 例接受 ADC 疫苗治疗者已复发或进展,9 例未接受 ADC 疫苗治疗者发生进展。1 例患者经过综合治疗后接受 ADC 疫苗免疫治疗,免疫治疗 2 个月后发现肺转移瘤灶,同期接受转移灶局部切除术,切除转移灶后随访 25 个月,未发生进展。

2.3 不良反应 免疫接种后 24~48h,实验组 20 例患者在 4 次免疫接种中至少有 1 次发生自限性风团皮肤反应,其中 4 例于再次免疫接种时出现较第一次更明显的自限性风团皮肤反应,但无其他特殊不适。4 例免疫接种 24h 出现轻微的乏力。以上反应均不需特殊处理,血常规、肝肾功能等指标均未发生异常。

3 讨论

乳腺癌是一种异质性疾病,所以不存在适合所有乳腺癌的标准治疗方法。以往多年来,肿瘤大小一直是乳腺癌主要分型特征。然而,这种乳腺癌分型方法被证实是有局限性的,因为它不能界定具有相同预后及治疗方法的分型。之后出现组织学分类系统,根据乳腺肿瘤组织学外观特点,将乳腺癌分为不同亚组^[5]。对于雌、孕激素双阴性乳腺癌患者,无需接受内分泌激素治疗,因此治疗方案选择限制于化疗。由于雌、孕激素双阴性乳腺癌呈现高复发率及低生存率的特点,针对雌、孕激素双阴性乳腺癌的治疗需要寻找一种瞄准新靶点的治疗方法。

ADC 为基础的疫苗成为对该类患者进行强化免疫治疗的关键策略。无论是采用手术、化疗还是放疗,达到减少肿瘤负荷后对抗少量残留肿瘤病灶,自体免疫应答可能是最有效的。尽管 ADC 免疫治疗方法已取得了良好的疗效,但诸多研究仅将此

作为辅助治疗方法^[6-7]。ADC 辅助治疗方法的实施往往出现在联合其他综合治疗的过程中,所以需要随机的研究来证明免疫治疗方法是否可以提供额外的疗效获益。反过来,要对其疗效进行有效评价,需要制定有关其使用的标准方案,如抗原类型、抗原负荷、DC 类型及移植方法,需要制定统一的治疗规范。只有这样才可以保证该治疗方法可以从特定患者的相关研究应用到成为一种作为乳腺癌治疗的可选方案来顺利实施。该疫苗把自身肿瘤抗原的低强度免疫应答转换为高强度的免疫原性反应,理论上可以产生巨大的抗肿瘤免疫力^[8-10]。

本研究利用一组细胞因子(GM-CSF、IL-4、IL-1、PGE2 和 TNF- α),从周围血单核细胞中生成肿瘤裂解物抗原致敏的 ADC。同时,利用细胞内染色方法测定 IFN- γ 含量以了解患者的特异性抗肿瘤的免疫应答反应。本研究发现再接受 ADC 疫苗后 IFN- γ^+ /CD8 $^+$ T 细胞含量上调,说明利用可识别肿瘤抗原的 ADC 接种免疫可以诱导细胞毒性 T 淋巴细胞反应,ADC 调动了机体特异性免疫反应,以发挥抗肿瘤作用。抗肿瘤 IV 型变态反应一种典型的细胞介导的免疫应答反应,自体肿瘤细胞致敏的 DC 可以引起体内抗原特异性 Th1 细胞免疫应答,而肿瘤患者体内的免疫应答偏向于 Th2 型细胞免疫应答,这可以通过降低的 Th1 细胞因子分泌量以及受损的 Th1 介导的抗肿瘤活性反映出来,Th1/Th2 细胞因子水平在肿瘤进展中扮演着重要的角色。在本研究中,实验组 58.1% 患者免疫应答阳性,对照组均为免疫应答阴性,表明 DC 在机体内发挥着抗原递呈作用,激活体内免疫系统,使得机体处于抗肿瘤状态。本研究证实,ADC 疫苗可提高患者的 3 年无进展生存率,然而未能够提高患者的总生存期,推测 ADC 疫苗通过诱导特异性免疫应答来影响患者的一般情况,还可通过控制肿瘤转移扩散而不是摧毁掉已经形成的原始肿块来影响患者的生活质量。

本研究也进行了治疗后随访,证明建立在 ADC 为基础的免疫治疗对于 II、III A 期雌、孕激素受体双阴性乳腺癌患者有一定疗效,从而证明自体肿瘤冻

融抗原致敏的 ADC 疫苗为肿瘤治疗提供了一种全新、特异、有效的手段。然而对于本研究中实验组患者 HER-2 的表达、Ki-67 状态、脉管侵犯等病理因素是否影响无疾病进展生存情况,仍需进一步的研究与分析,本研究为单中心、小样本临床试验,且随访时间较短,是否有更好的疗效还需大规模临床试验证实。

参考文献

- [1] 耿一婷,蒋敬庭,吴昌平,等. 树突状细胞与胃癌免疫治疗的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2012,17(12):1136-1140.
- [2] Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees[J]. Cancer Invest, 2003, 21(6):873-886.
- [3] Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG[J]. Ann Oncol, 2006, 17(4):563-570.
- [4] Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells[J]. Nat Med, 1998, 4(3):328-332.
- [5] de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2):183-192.
- [6] Yu B, Kusmartsev S, Cheng F, et al. Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1):285-294.
- [7] Emens LA, JaVee EM. Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy[J]. Cancer Res, 2005, 65(18):8059-8064.
- [8] Lopez MN, Pereda C, Segal G, et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(6):945-952.
- [9] Hirschowitz EA, Foody T, Kryscio R, et al. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(14):2808-2815.
- [10] Turnis ME, Rooney CM. Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer[J]. Immunotherapy, 2010, 2(6):847-862.

收稿日期:2013-03-25; 修回日期:2013-05-14