

## 胰腺癌冷冻治疗及冷冻免疫

唐勇 苑占娜 刘凤华 综述 郝继辉 审校

**摘要** 胰腺癌是预后极差的肿瘤,当前各种治疗手段效果均不佳。冷冻在各种实体瘤的治疗中已取得较好效果,但在胰腺癌治疗中的作用报道甚少。体内外实验表明冷冻可毁损肿瘤细胞,安全性好。临床研究显示:冷冻为主综合治疗中晚期胰腺癌,中位生存期达13.4~16个月,1年生存率57.5%~63.6%;安全性好,主要并发症为:胃排空障碍的发生率为0~40.9%;胰漏发生率为0~6.8%;胆漏的发生率为0~6.8%。更为重要的是,肿瘤冷冻消融后,以坏死肿瘤细胞和细胞碎片的形式,释放大量肿瘤抗原,诱导冷冻后免疫,可抑制肿瘤的生长和转移。将局部冷冻消融治疗与全身免疫治疗相结合,可为中晚期肿瘤综合治疗提供新的治疗技术与方法。

**关键词** 胰腺癌 冷冻消融 冷冻免疫 安全性 有效性

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.14.015

### Cryotherapy and Cryoimmunotherapy for Pancreatic Cancer

Yong TANG, Zhanna YUAN, Fenghua LIU, Jihui HAO

Correspondence to: Yong TANG; E-mail: ty369@yahoo.cn

Department of Pancreatic Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

**Abstract** The prognosis of pancreatic cancer patients is extremely poor, and the cure effects of various treatments are not quite satisfactory. Cryosurgery has achieved good results in the treatment of various solid tumors. However, little pancreatic cancer data have been reported. *In vitro* and *In vivo* experiments show that cryosurgery destroys tumor cells and has good security. Clinical studies have indicated that in the freezing-based comprehensive treatment of advanced pancreatic cancer, the median survival ranges from 13.4 months to 16 months, and the 1-year survival rate is between 57.5% and 63.6%. These figures indicate that cryotherapy is safe for patients. Its major complications include delayed gastric emptying (0% to 40%), pancreatic leakage (0% to 6%), and biliary leakage (0% to 6.8%). Most importantly, after cryoablation, the tumor releases large amounts of antigens in the form of cell necrosis byproducts and debris, which induce freeze immunity and then inhibit tumor growth and metastasis. Most importantly, local cryoablation combined with systemic immunotherapy could provide new advanced cancer treatment techniques and strategies.

**Keywords** Pancreatic cancer; Cryoablation; Cryoimmunotherapy; Security; Effectiveness

胰腺癌预后极差,近年来发病率逐年升高。虽然各种技术不断改进,但患者长期生存率仍很低,据CA报道,5年生存率为5%~6%<sup>[1]</sup>。根治性切除术是目前唯一可能治愈胰腺癌的手段,但因确诊时已为晚期及胰腺解剖位置关系,适合手术切除的患者仅有15%~20%。化疗是治疗胰腺癌的另一重要手段,但其敏感性差,有效率为20%。积极寻找其他替代治疗对改善胰腺癌患者生存期和生活质量具有重要的意义。肿瘤局部冷冻作为一种姑息性治疗方式在各种实体瘤的治疗中已取得明显效果,但在胰腺癌治疗中的作用报道尚少,本文对相关研究做一综述。

### 1 胰腺癌的冷冻治疗

#### 1.1 有效性

早在1851年就有人用低温治疗肿瘤,现代冷冻

治疗肿瘤始于1963年Cooper<sup>[2]</sup>采用液氮冷冻治疗恶性肿瘤。其后Cahan和Gage采用冷冻治疗肛管直肠癌等其他恶性肿瘤<sup>[3-4]</sup>。冷冻外科能直接杀伤肿瘤细胞的事实逐步被人们认识<sup>[5]</sup>。根据国际权威前列腺癌冷冻治疗Cryo-On-Line数据库资料分析结果,冷冻治疗用于前列腺癌术后复发的补救性治疗,患者5年生存率约59%<sup>[6]</sup>。2002年,Koch等<sup>[7]</sup>报告中晚期胰腺癌局部冷冻的效果。随后国内多家医院开展了中晚期胰腺癌的冷冻治疗。

实验研究表明,胰腺组织置于-80℃~-180℃,局部受到冷毁损,可导致无菌性冷冻坏死和凋亡,区域毛细血管循环滞止,可抗血管生成<sup>[8]</sup>。此外,冷冻治疗除低温破坏肿瘤组织产生冷冻坏死外,肿瘤组织冷冻损伤后,可释放组织特异性抗原,刺激机体产

生特异性抗体,引起抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤生长,从而增强冷冻治疗的效果<sup>[9-10]</sup>。

冷冻治疗胰腺疾病可追溯到上世纪的80年代,最先用于胰腺炎的治疗;<sup>[11]</sup>用于胰腺癌治疗是近年来才开始逐渐增多,所以相关文献尚少。本研究检索了数据库PubMed、EBSCO、Springer、Ovid、外文医学期刊全文数据库和CNKI以及Cochrane图书馆(2008年第1期),文献检索起止时间均从建库至2009年12月。初步检索到文献29篇,英文20篇,中文9篇。分析总结文献,3项研究共97例,计算出中位生存期,13.4~16个月<sup>[12-14]</sup>。有两项研究共59例统计了1年生存率,分别为57.5%和63.6%<sup>[12-13]</sup>。3项研究共62例统计了疼痛缓解率,为66.7%~100%<sup>[7,13,15]</sup>。

表1 冷冻治疗的有效性

Table 1 Efficacy of cryotherapy

研究	例数	1年生存率/%	疾病缓解情况/%	中位生存期(月)
武清 <sup>[12]</sup>	15	63.60		13.4
易峰涛 <sup>[15]</sup>	8	—	5例腹痛100(5/5)	—
李波 <sup>[13]</sup>	44	57.50	89.7(34/38)	14
Kovach <sup>[7]</sup>	10	—	66.7(6,9)	—
Xu <sup>[14]</sup>	38	—	—	16

## 1.2 安全性

McIntosh等<sup>[16]</sup>早在80年代用猪模型做实验,同时冷冻胰腺和门静脉,观察结果显示冷冻不会导致门脉阻塞、破裂或扩张,冷冻完全损毁的胰腺组织被颗粒组织代替。新近,Chen等<sup>[17]</sup>进一步在猪模型上探讨了冷冻的安全性,实验结果显示,中度低温表面快速冷冻可损伤胰腺组织,导致胰腺炎;深度低温冷冻足够时间可毁损胰腺组织,防止胰腺炎。

临床上最为常见的并发症为胃排空功能障碍<sup>[13]</sup>,较少患者出现胆漏和胰漏。前述检索文献,3个研究(67例)描述了冷冻治疗术后胃排空障碍的发生率,为0~40.9%<sup>[12-13,15]</sup>;4个研究(77例)描述了胰漏的发生率,为0~6.8%<sup>[7,12-13,15]</sup>;3个研究(105例)统计了胆漏的发生,0~3例(0~6.8%)<sup>[12-13,15]</sup>;1个研究(8例)描述了1例上消化道出血的发生<sup>[15]</sup>;所有研究均未发现腹腔内出血。

## 2 冷冻后免疫

肿瘤免疫治疗逐渐成为一项重要治疗手段,已在肿瘤治疗中获得可喜疗效,特别是针对恶性黑色素瘤<sup>[18]</sup>。值得关注的是,冷冻消融不仅可控制局部肿瘤增长,还可产生针对肿瘤的免疫反应,使转移瘤消失。冷冻免疫反应是指冷冻消融后肿瘤坏死释放肿瘤抗原,刺激体内免疫系统产生抗肿瘤免疫反应,有利于清除体内残留癌细胞。冷冻免疫反应的

研究最早见于20世纪70年代,Soanes观察到冷冻治疗前列腺癌原发灶后发现肺部转移灶消失,并提出冷冻术后可增强免疫功能的设想,而引起广泛关注<sup>[19]</sup>。1972年Southam<sup>[20]</sup>发现肿瘤冷冻消融能使宿主在解除麻痹的条件下,获得对肿瘤细胞的特异免疫性。其后,较多报道指出肿瘤冷冻后具有免疫作用<sup>[21]</sup>。通过进一步研究表明冷冻治疗后残余瘤组织也可使产生抗体<sup>[22]</sup>。

表2 冷冻治疗中晚期胰腺癌的安全性分析 例

Table 2 Security of cryotherapy for intermediate and advanced pancreatic cancer

研究	例数	胃排空障碍/%	胰漏/%	胆漏/%	上消化道出血	腹腔内出血
Kovach <sup>[7]</sup>	10	—	0	—	0	0
李波 <sup>[13]</sup>	44	40.9(18)	3(6.8%)	3(6.8%)	0	0
武清 <sup>[12]</sup>	15	—	0	1	0	0
易峰涛 <sup>[15]</sup>	8	25(2)	0	—	1	0
Xu <sup>[14]</sup>	38	—	—	0	0	0

肿瘤冷冻消融后,以坏死肿瘤细胞和细胞碎片的形式,释放大量肿瘤抗原,携带抗原的树突状细胞(dendritic cell, DC)从肿瘤引流至淋巴结<sup>[23-24]</sup>。从而在淋巴结中诱导肿瘤特异性T细胞,增加全身NK细胞的活性,与排斥肿瘤细胞再发相关。动物实验表明,冷冻消融可促进淋巴细胞肿瘤特异性干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )分泌、提高自然杀伤细胞、细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)的特异性杀伤活性等,但对转移瘤或再种植肿瘤的抑制作用较弱。有学者利用<sup>111</sup>In-KLH、<sup>111</sup>In-OVA标志, $\gamma$ 相机追踪技术,证实肿瘤冷冻治疗后坏死组织可作为有效肿瘤抗原被肿瘤引流淋巴结树突状细胞(dendritic cell, DC)摄取,进而完成抗原递呈过程,从而诱导肿瘤特异性免疫反应<sup>[17]</sup>。推测冷冻使细胞膜破碎,释放未受损的肿瘤抗原,被抗原递呈细胞递呈给肿瘤引流淋巴结中抗肿瘤的淋巴细胞<sup>[25]</sup>。

尽管冷冻消融可诱导免疫反应,但肿瘤患者免疫反应常明显受到限制,可能有必要使用辅助剂<sup>[26]</sup>。另外,调节性T细胞-CD4 T细胞亚群,下调肿瘤宿主对肿瘤抗原反应的能力,这些细胞抑制细胞毒T淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK),从而潜在抑制免疫,被认为在肿瘤和自身抗原耐受中起作用<sup>[27-28]</sup>。为扩大免疫反应,有学者使用肿瘤冷冻后抗肿瘤免疫作用联合自身未修饰的非成熟DC的局部注射来扩大免疫反应<sup>[29]</sup>。也有研究在局部肿瘤消融时,阻断针对细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)单克隆抗体<sup>[30]</sup>,Toll样受体9(toll-like receptor, TLR)配体<sup>[23]</sup>,或用IL-2和GM-CSF等免疫治疗<sup>[31]</sup>。近来,Levy<sup>[32]</sup>等报道肿瘤冷

冻消融联合环磷酰胺(Cyclophosphamide, CY)可诱导转移肿瘤动物模型潜在的全身抗肿瘤免疫,并发现冷冻消融联合CY比外科手术或射频消融对诱导全身抗肿瘤免疫治疗更有效,对部分转移性肿瘤动物模型的复发,及肿瘤的发展有抵抗作用。研究发现在治愈动物的淋巴结中,含有 $\gamma$ 干扰素刺激产生的T细胞群和转换的抗肿瘤天然免疫,具有扩展肿瘤特异性功能。更多的是,冷冻消融和CY联合治疗与CD4T细胞调节比例的下降相关<sup>[33]</sup>。研究提示,冷冻后免疫反应可通过调节而强化。局部冷冻消融治疗与全身免疫治疗方法为中晚期肿瘤综合治疗提供新的途径。

#### 参考文献

- Jema A, Siege R, Xu J, et al. Cancer Statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-330.
- Cooper IS. A new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissue[J]. New Eng J med, 1963, 268: 743-749.
- Cahan WG. Cryosurgery for malignant and benign tumors[J]. Fed Proc, 1965, 24: 241.
- Gaga AA. Cryotherapy for inoperable rectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 1968, 11(1): 36-44.
- Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Science, 1986, 233(4770): 1318-1321.
- Jones JS, Rewcastle JC, Donnelly BJ, et al. Whole gland primary prostate cryoablation: initial results from the cryo on-line data registry [J]. J Urol, 2008, 180(2): 554-558
- Kovach SJ, Hendrickson RJ, Cappadona CR, et al. Cryoablation of unresectable pancreatic cancer[J]. Surgery, 2002, 131(4): 463-464.
- Korpan NN. Cryosurgery: ultrastructural changes in pancreas tissue after low temperature exposure[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(2): 59-67.
- Joosten JJ, Muijen GN, Wobbes T, et al. In vivo destruction of tumor tissue by cryoablation can induce inhibition of secondary tumor growth: an experimental study[J]. Cryobiology, 2001, 42(1): 49-58.
- Hamad GG, Neifeld JP. Biochemical hematologic and immunologic alterations following hepatic cryotherapy[J]. Semin Surg Oncol, 1998, 14(2): 122-128.
- Al'perovich BI, Merzlikin NV, Tiul'kov GI. Cryosurgical treatment of acute destructive pancreatitis[J]. Klin Khir, 1982, (11): 7-10.
- 武清, 张家兴, 钱建新, 等. 手术联合氩氦靶向冷冻消融在中晚期胰头癌中的应用[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(24): 1403-1405.
- 李波, 李敬东, 陈晓理, 等. 无法切除的胰腺癌的冷冻手术治疗(附44例报告)[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(8): 523-525.
- Xu KC, Niu LZ, Hu YZ, et al. Cryosurgery with combination of (125) iodine seed implantation for the treatment of locally advanced pancreatic cancer[J]. J Dig Dis, 2008, 9(1): 32-40.
- 易峰涛, 宋华志, 李静. 术中氩氦刀治疗晚期胰腺癌[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(3): 186-187.
- McIntosh GS, Hobbs KE, O'Reilly AP. In situ freezing of the pancreas and portal vein in the pig[J]. Cryobiology, 1985, 22(2): 183-190.
- Chen XL, Ma Y, Duan LG. Experimental study of the safety of pancreas cryosurgery: the comparison of 2 different techniques of cryosurgery[J]. Pancreas, 2010, 39(1): 92-96.
- Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1[J]. N Engl J Med, 2008, 358(25): 2698-2703.
- Soanes WA, Gonder MJ. Use of cryosurgery in prostatic cancer[J]. J Urol, 1968, 99(6): 793-797.
- Soanes WA, Ablin RJ, Gonder MJ. Remission of metastatic lesions following cryosurgery in prostatic cancer[J]. J Urol, 1970, 104(1): 154-159.
- Southam CM. Immunotherapeutic trials in sarcoma patients using autogenous tumor vaccine. Proceedings of the 7th annual San Francisco cancer sym[W]. 1972: 199.
- Bellanti JA, Rocklin RE. Cell-mediated immune reactions. In: Bellanti JA. Immunology[M]. Philadelphia: Saunders, 1985: 176.
- Sauter BB, Albert ML, Francisco L, et al. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells[J]. J Exp Med, 2000, 191(3): 423-433.
- Gazzaniga S, Bravo A, Goldszmid SR, et al. Wainst R Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(5): 664-671.
- den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity[J]. Br J Cancer, 2006, 95(7): 896-905.
- Sabel MS, Nehs MA, Su G, et al. Chang AE. Immunologic response to cryoablation of breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 90(1): 97-104.
- Smyth MJ, Teng MW, Swann J, et al. CD4+CD25+T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer[J]. J Immunol, 2006, 176(3): 1582-1587.
- Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(2): 217-223.
- Machlenkin A, Goldberger O, Tirosh B, et al. Combined Dendritic Cell Cryotherapy of Tumor Induces Systemic Antimetastatic Immunity[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13): 4955-4961.
- den Brok MH, Suttmuller RP, vander Voort R, et al. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 4024-4029.
- den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Synergy between in situ cryoablation and TLR9 stimulation results in a highly effective in vivo dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7285-7292.
- Levy MY, Sidana A, Chowdhury WH, et al. Cyclophosphamide unmasks an antimetastatic effect of local tumor cryoablation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 330(2): 596-601.
- Ito A, Tanaka K, Kondo K, et al. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma[J]. Cancer Sci, 2003, 94(3): 308-313.

(2012-03-13 收稿)

(2012-04-20 修回)

(本文编辑: 贾树明)