

• 临床研究 Clinical research •

肝动脉化疗栓塞术联合自体 DC-CIK 细胞治疗 BCLC C 期肝癌的随机对照研究

刘 丽, 钟嘉明, 陈晓霞, 丁 宁, 钱其军, 曲增强

【摘要】 目的 探讨肝动脉化疗栓塞(TACE)联合 DC-CIK 细胞治疗 BCLC C 期肝细胞癌的疗效。方法 60 例 BCLC C 期 HCC 患者随机分为治疗组与对照组, 治疗组患者采用 TACE 联合 DC-CIK 治疗, 对照组患者只行 TACE 治疗, 比较两组患者的免疫功能、半年和 1 年生存率。结果 治疗组全血 T 细胞亚群 CD3+CD8+ 明显升高, CD3+CD4+ 明显下降, 较治疗前差异有统计学意义 ($P<0.05$)。两组半年生存率分别为 67.9%、48.1% ($P<0.05$), 一年生存率分别为 53.6%、29.6% ($P<0.05$)。结论 TACE 联合 DC-CIK 细胞联合治疗比单纯 TACE 治疗效果更好, 是 BCLC C 期肝细胞癌的一种有效的治疗方法。

【关键词】 肝细胞癌; 肝动脉化疗栓塞; DC-CIK; 免疫功能; T 淋巴细胞亚群

中图分类号: R735.7 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2015)-05-0434-05

Transarterial chemoembolization combined with autologous DC-CIK cells for the treatment of hepatocellular carcinoma of BCLC C-stage: a randomized controlled study LIU Li, ZHONG Jia-ming, CHEN Xiao-xia, DING Ning, QIAN Qi-jun, QU Zeng-qiang. Section II, Department of Interventional Radiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Corresponding author: QU Zeng-qiang, E-mail: zqqu@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the efficacy of transarterial chemoembolization (TACE) combined with autologous DC-CIK cells in treating hepatocellular carcinoma (HCC) of BCLC C-stage. **Methods** A total of 60 cases with HCC in BCLC C-stage were randomly and equally divided into the study group ($n=30$) and the control group ($n=30$). TACE combined with autologous DC-CIK cells was employed in the patients of the study group, while only TACE was adopted in the patients of the control group. The immune function, six-month and one-year survival rates were determined, and the results were compared between the two groups. **Results** In the study group, the blood T lymphocyte subsets of CD3+CD8+ were significantly increased, while CD3+CD4+ were obviously decreased. When compared with the pretreatment levels, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The six-month survival rate of the study group and the control group was 67.9% and 48.1% respectively ($P<0.05$), and the one-year survival rate of the study group and the control group was 53.6% and 29.6% respectively ($P<0.05$). **Conclusion** For the treatment of HCC in BCLC C-stage, the therapeutic effect of TACE combined with autologous DC-CIK cells is much better than that of pure TACE. Therefore, this therapy is an effective treatment for HCC in BCLC C-stage. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 434-438)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; hepatic arterial chemoembolization; DC-CIK; immune function; T lymphocyte subsets

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2015.05.018

作者单位: 200438 上海 第二军医大学附属东方肝胆外科医院放射介入二科 (刘 丽、钟嘉明、陈晓霞、丁宁、曲增强), 基因与病毒治疗实验室 (钱其军)

并列第一作者: 刘 丽、钟嘉明

通信作者: 曲增强 E-mail: zqqu@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)患者多数就诊时已是晚期,已经失去手术指征^[1]。TACE是目前晚期肝癌患者首选的治疗方式,可以有效控制肝内病灶进展,但是TACE不能使病灶完全坏死,并且对患者免疫功能造成损伤^[2]。经过长时间的探索,人们认识到肿瘤免疫治疗在肿瘤治疗中起到重要作用,特别是近年新兴的细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killers,CIK)在杀伤肿瘤细胞、调节机体免疫功能方面有一定的效果,能在一定程度上降低肿瘤复发和转移,目前应用CIK细胞治疗肝癌已经成为肝癌治疗的一种新手段^[3]。本研究旨在探讨TACE术联合DC-CIK组(治疗组)与单纯TACE治疗组(对照组)在晚期肝细胞癌治疗效果的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 所选病例为2012年9月至2013年9月在上海东方肝胆外科医院初次诊断为巴塞罗那(BCLC)C期肝细胞癌的住院患者。共入组60例,年龄27~75岁,所有患者均合并乙肝病毒感染并有不同程度肝硬化,入组患者随机分为2组,治疗组30例,均行TACE联合DC-CIK细胞回输治疗。对照组30例,只行TACE治疗。患者入选标准:①经影像学、AFP明确诊断的肝细胞癌;②初次诊断,经临床证实为无法行手术治疗的患者,既往未接受过索拉菲尼、微波、射频、放疗等治疗;③BCLC肝癌分期为C期:合并门静脉癌栓或肺转移者;④肝功能为Child-Pugh分期为A或B,无TACE禁忌证者。⑤本研究所有对象已充分了解并自愿签署知情同意书,报告医院伦理委员会经批准后实行。两组患者一般资料见表1。

1.1.2 主要试剂和仪器 ①TACE治疗所用药物及仪器:表阿霉素、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、超液化碘化油、明胶海绵颗粒,数字减影血管造影机(digital subtraction angiography,DSA);②流式细胞分析所需抗体及试剂、仪器:CD3-FITC、CD4-PC5、CD56-PE、CD16-PC5、CD25-APC、CD127-PE抗体(Beckman公司),红细胞裂解液,PBS(磷酸盐1缓冲液),流式细胞仪FACScalibur(Becon Dickinson公司产品);③DC-CIK培养所需仪器与试剂:淋巴细胞分离液,IL-2(Pepro Tech公司),Retronectin(TaKaRa公司),AIM-V(Gibco公司),淋巴细胞分离液(GE公司),血细胞分离机,微量移液枪(GILSON和

表1 治疗组和对照组患者一般资料比较 (例)

参数	治疗组	对照组
例数	30	30
性别(男/女)	26/4	24/6
年龄		
<60	19	21
≥60	11	9
乙型肝炎表面抗原阳性	30	30
甲胎蛋白≥400 ng/ml	20	17
Child-Pugh 分级		
A 级	24	25
B 级	6	5
肿瘤类型		
巨块型	22	24
多结节型	8	6
血管癌栓	18	20
肺转移	7	7
癌栓及肺转移	5	3

注:经 χ^2 检验,A组和B组各项指标差异均无统计学意义($P>0.05$)

EPPENDORF公司),Minispin小型离心机(EPPENDORF公司),HF90/HF240 CO₂培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司),超净工作台(上海康城和空气净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DC-CIK细胞体外诱导和扩增 实验组患者血细胞分离机采集外周血单核细胞,经淋巴细胞分离液进一步分离纯化,贴壁2h后分成2部分处理。①悬浮细胞:收集接种细胞(40 ml无血清细胞培养液重悬分离层细胞+1 000 u/ml IL-2+1 000 u/ml γ -IFN),加入到包被有anti-Human CD3(5 μ g/ml)+RetroNetin(12.5 μ g/ml)的一个T75培养瓶中。第3天,视细胞生长情况,补1 000 u/ml IL-2(完全培养液)40 ml。第4天转袋,由1个培养瓶转至2个培养袋中,400 ml/袋继续培养。每2天换液并补充因子。②贴壁细胞:加入含有rhGM-CSF(100 ng/ml)、rhIL-4(100 ng/ml)和FLT3L(50 ng/ml)的AIM-V培养基继续培养,37℃、5%CO₂孵育箱中培养7 d。在第4天补充上述浓度细胞因子。第6天负载肝癌抗原。第7天加入TNF- α 100 ng/ml,LPS 100 ng/ml,PGE-2 100 ng/ml,促进树突状细胞成熟。

共培养:第8天,收集成熟的DC细胞,计数。将成熟的DC细胞和扩增的CIK细胞以1:50的比例共培养。第11天,每袋细胞添加0.5倍的无血清细胞培养液和相应的IL-2,计数并取样检查细菌、真菌、内毒素、支原体为阴性,锥虫蓝染色法计数活细胞数量,成活率后收集细胞。生理盐水500 ml+IL-2 50万 u+20%人血白蛋白50 ml重悬细胞加入细胞回输袋,分3次回输给患者。

1.2.2 治疗方案 60 例患者均行 TACE 治疗,术中应用化疗药物主要为表阿霉素和 5-Fu,并应用超液化碘化油和明胶海绵颗粒栓塞肿瘤供血血管。2 次 TACE 术治疗间隔时间根据患者复查时情况决定,至少间隔 1 个月。治疗组患者 TACE 治疗期间行 DC-CIK 回输治疗,TACE 治疗与细胞回输至少间隔 1 周,细胞回输前给予 12.5 mg 盐酸异丙嗪,从回输细胞次日起隔天注射 IL-2 增强回输细胞活性,共注射 2 周。每次回输细胞数量不低于 10^9 个。2 次细胞回输间隔 1 个月。

1.2.3 观察指标及疗效评定 观察指标包括免疫功能、瘤体及甲胎蛋白(AFP)变化、不良反应、半年及 1 年生存率。流式细胞仪检测外周血淋巴细胞亚群(CD3+ T 细胞,CD3+CD4+ T 细胞,CD3+CD8+ T 细胞,CD4+T/CD8+ T),调节性 T 细胞(CD3+CD4+CD25+CD127+ Treg)及 NK 细胞(CD3+CD16+CD56-)比例,每次复查均检测肝功能、血常规、肿瘤标志物、增强 CT 或 MRI,CT 扫描仪保存影像资料,其余资料拍照保存。半年、1 年时电话随访患者生存情况。

1.3 统计分析

所有实验数据均采用 SPSS 18.0 软件进行统计

学处理。TACE 治疗前后外周血淋巴细胞数量及淋巴细胞各亚群比例的变化、治疗组 DC-CIK 细胞回输前后患者外周血淋巴细胞亚群比例变化采用配对样本 T 检验;存活率及临床疗效比较采用生存分析 Kaplan-Meier 检验,临床样本特征比较采用 χ^2 检验。以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TACE 治疗前后淋巴细胞数量、T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞比例的变化

60 例患者 TACE 治疗前及治疗后第 3 天查血常规,及抽外周血进行 T 细胞亚群及 NK 细胞检测。除去实验组某些患者 TACE 治疗前血细胞分离机分离外周血单核细胞影响,共获得 43 组数据,结果显示 TACE 治疗后患者外周血淋巴细胞数量明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$)。CD3+ T 细胞、CD3+CD4+ T 细胞、CD3+CD8+ T 细胞、CD3-CD56+ NK 细胞、Treg 细胞的比例与治疗前比较无明显变化($P>0.05$)。(见表 2)

表 2 TACE 前后患者外周血淋巴细胞亚群变化

时间	数量	CD3+(%)	CD3+CD4+(%)	CD3+CD8+(%)	NK(%)	Treg(%)
治疗前	1.63±0.62	65.46±13.84	34.17±10.46	31.33±10.79	19.70±10.92	7.94±3.43
治疗后	1.15±0.51	67.26±14.16	35.66±12.39	31.75±10.04	17.24±9.27	7.79±3.72
P 值	<0.01	0.32	0.38	0.77	0.11	0.76

注:采用配对样本 T 检验,以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义

2.2 DC-CIK 细胞回输前检测细胞表型

治疗组患者 DC-CIK 细胞体外培养 11 d,回输前取样本流式细胞仪检测细胞表型,结果显示 CD3+CD8+ T 细胞比例大大增加,甚至达到 80%以上。(见图 1)锥虫蓝染色法计数活细胞数量,细胞数量均能达到 10^9 以上。

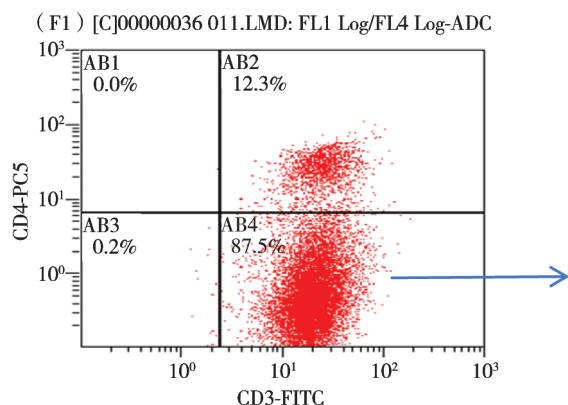


图 1 细胞回输前流式细胞仪检测细胞表型

2.3 治疗组患者治疗前后 T 细胞亚群及 NK 细胞变化

治疗组患者开始治疗前及 DC-CIK 细胞回输 2 次后 1 个月复查时抽外周血检测 T 细胞亚群和 NK 细胞,结果显示 CD3+CD8+ 细胞的比例明显升高,CD3+CD4+ 细胞比例明显下降,较回输前差异有统计学意义($P<0.05$)。CD3+ 细胞比例较回输前上升,差异无统计学意义($P>0.05$)。NK 细胞、Treg 细胞回输前后比例均无明显差别,前后比较无统计学差异($P>0.05$)。(见表 3)

2.4 两组患者生存率比较

治疗组:随访 28 例,失访 2 例,半年生存 19 例(生存率 67.9%),1 年生存 15 例(生存率 53.6%)。对照组:随访 27 例,失访 3 例,半年生存 13 例(生存率 48.1%),1 年生存 8 例(生存率 29.6%)。采用两独立样本生存率的 Kaplan-Meier 检验检测治疗组和对照组半年生存率及一年生存率差异均有统计学

表 3 DC-CIK 细胞回输前后患者外周血 T 细胞亚群的变化

时间	CD3+ (%)	CD3+CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)	NK (%)	Treg (%)
治疗前	65.42±11.55	37.33±10.03	28.09±9.34	15.13±8.61	6.43±2.30
回输后	66.91±11.58	31.97±7.92	34.93±12.11	16.15±7.63	6.21±2.67
P 值	0.484	0.005	0.006	0.652	0.652

注:a:采用配对样本 T 检验,以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 表示具有统计学意义

意义($P<0.05$)。治疗组与对照组生存曲线如图(见图 2)。

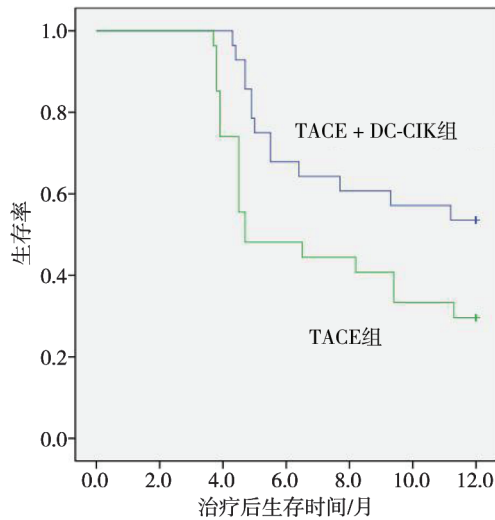


图 2 治疗组与对照组患者生存曲线图

3 讨论

晚期肝细胞癌患者因合并肝硬化等基础疾病、门脉癌栓、肝内及远处转移等,不适宜进行手术治疗。TACE 治疗晚期肝癌有确切的治疗效果,能最大限度保存肝功能,较少导致严重的并发症,已经成为此期患者首选的治疗措施^[4]。但是 TACE 并不能使肿瘤病灶完全坏死,并且 TACE 治疗会对患者的免疫功能造成损伤,治疗后肝癌局部复发及远处转移发生率高^[5]。近年来一系列不同的研究证明抗肿瘤免疫与患者预后关系密切^[6]。加强肝癌局部及全身抗肿瘤免疫反应可降低肝癌治疗后肿瘤复发转移率,改善患者的预后^[7]。因此将 TACE 联合肿瘤免疫治疗是目前肝癌治疗研究的重要内容。

DC 细胞,是人体最强的抗原提呈细胞。肝细胞癌患者体内免疫功能通常处于抑制状态,DC 细胞成熟分化障碍,功能缺陷,不能有效提呈抗原,不能使 T 淋巴细胞激活,造成肝癌患者抗肿瘤免疫低下^[8]。DC-CIK 细胞生物治疗指 DC 与 CIK 细胞共培养。体外应用各种细胞因子诱导 DC 细胞分化成熟,纠正肿瘤患者体内 DC 细胞功能低下、抗原提呈功能缺陷的特点,并以肿瘤抗原刺激 DC 细胞使其致敏,再与 CIK 细胞共培养。DC 细胞提呈肿瘤抗原使

CIK 细胞活化,回输体内后能识别肿瘤细胞并发挥特异性杀伤作用^[9]。CD3+CD8+ 表型为活化 T 细胞表型^[10]。本研究证实,DC 细胞与 CIK 细胞共培养后,CD3+CD8+ T 淋巴细胞比例明显上升,说明 DC-CIK 细胞中抗肿瘤效应细胞比例大大增加。有文献报道作为辅助治疗,DC-CIK 细胞治疗在多种肿瘤中与其他治疗方式联合,清除残余癌细胞,改善患者治疗后免疫功能,提高患者长期生存率^[11]。

外周血淋巴细胞数量及亚群比例均与免疫功能有关。肿瘤患者外周血常出现淋巴细胞数量及亚群比例异常,如淋巴细胞数量下降及 CD3+CD8+ T 细胞比例下降等免疫功能抑制的表现^[12]。另外 Treg 比例升高也是肿瘤患者免疫抑制的一个重要机制^[13]。本研究中 TACE 术后外周血淋巴细胞总体数量显著下降($P<0.01$),各亚群比例无明显变化($P>0.05$),提示 TACE 治疗对肿瘤患者免疫功能造成损伤,这种免疫功能的损伤可能是由于术中应用化疗药物,其非特异性细胞毒性作用导致。实验组患者 TACE 联合 DC-CIK 细胞回输治疗后,CD3+CD8+ T 淋巴细胞比例明显上升、CD3+CD4+ T 淋巴细胞比例明显下降($P<0.05$),CD3+ T 淋巴细胞、NK 细胞及 Treg 细胞比例均无明显变化($P>0.05$)。证明患者联合治疗后,机体抗肿瘤免疫功能显著增强。联合治疗组患者半年、1 年生存率明显高于对照组($P<0.05$),证明联合 DC-CIK 细胞对控制肿瘤进展发挥了重要作用。

TACE 常见不良反应为恶心、呕吐及发热等,患者精神、食欲、睡眠等一般情况较差。治疗组患者细胞回输后一般情况好转,回输后不良反应仅表现回输当天部分患者出现发热反应,因此联合 DC-CIK 治疗安全可靠。肝动脉化疗栓塞术联合 DC-CIK 细胞输注治疗晚期肝细胞癌患者,提高肝癌患者机体的免疫力,控制了肿瘤的生长,改善患者的生活质量,延长患者生存期,是晚期肝细胞癌的一种有效治疗方法。

[参考文献]

[1] Zhang J, Jin H, Liu H, et al. MiRNA-99a directly regulates AGO2

- through translational repression in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2014, 3: e97.
- [2] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association [J]. *Hepatology*, 2012, 55: 2005-2023.
- [3] Pan K, Li YQ, Wang W, et al. The efficacy of Cytokine-Induced killer cell infusion as an adjuvant therapy for postoperative hepatocellular carcinoma patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20: 4305-4311.
- [4] Lencioni R, Petruzzi P, Crocetti L, et al. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Intervent Radiol*, 2013, 30: 3-11.
- [5] 谭智勇, 黄 婕, 龚建平, 等. CIK 细胞在肝癌治疗中的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2014, 12: 99-102.
- [6] 邓武坚, 陈锦武, 罗颖嘉, 等. 微创治疗联合自体 CIK 细胞输注对肝癌的疗效及安全性研究[J]. *岭南现代临床外科*, 2013, 13: 29-31.
- [7] Lauvau G, Chorro L, Spaulding E, et al. Inflammatory monocyte effector mechanisms[J]. *Cell Immunol*, 2014, 291: 32-40.
- [8] Shirabe K, Motomura T, Muto J, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: pathology and clinical management[J]. *Int J Clin Oncol*, 2010, 15: 552-558.
- [9] Jiang J, Wu C, Lu B, et al. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity[J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 83.
- [10] 盛立霞, 邱国强, 谢晓宝, 等. 两种白血病细胞抗原负载 DC 的体外诱导特异性 CTL 应答的比较[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21: 205-209.
- [11] Molla N, Almenieir N, Simoneau E, et al. The role of interventional radiology in the management of hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Oncol*, 2014, 21: e480-e492.
- [12] 李懿珺, 徐 立, 陈敏山, 等. 栓塞化疗对肝癌患者细胞亚群的影响及其与临床疗效的关系[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2011, 3: 35-39.
- [13] 彭启全, 李升平, 徐 立, 等. 117 例肝癌患者外周血调节 T 细胞水平及其临床意义[J]. *癌症*, 2007, 26: 748-751.

(收稿日期:2014-11-04)

(本文编辑:俞瑞纲)

·临床研究 Clinical research·

CT 引导下颅脑穿刺活检术 23 例

刘 健, 刘瑞青, 曹会存, 王振豫, 曹广劭, 刘诗义, 李天晓

【摘要】 目的 探讨 CT 引导下颅脑占位穿刺活检术对神经系统疾病的诊断意义及安全性。**方法** 2013 年 4 月至 2014 年 6 月行 CT 引导下颅脑占位穿刺活检术共 23 例。所有患者均具有神经系统临床症状或体征,影像学检查提示颅内占位。CT 引导下颅脑占位穿刺活检术行病理学或细菌学检查,对其结果进行分析。**结果** 本组患者中明确病理诊断 19 例,活检阳性诊断率 82.6%(19/23)。其中 14 例(60.9%)获得肿瘤学病理诊断,主要包括脑胶质瘤、非霍奇金淋巴瘤、胚胎发育不良性神经上皮肿瘤、脉络丛乳头状瘤、表皮样囊肿等;5 例(21.7%)为非肿瘤性病变,包括脓肿、脑胶质细胞增生症、脑毛细血管扩张症等。活检穿刺术后少量血肿者 1 例(4.3%),本组病例穿刺活检术后无颅内感染、癫痫等并发症。**结论** CT 引导下脑穿刺活检术创伤小,并发症少,可以为颅脑病变提供明确病理学诊断,是一种具有较广阔应用前景的技术。

【关键词】 颅脑病变; 穿刺活检; CT 引导技术

中图分类号:R739.4 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2015)-05-0438-04

The clinical application of CT-guided craniocerebral puncture biopsy: initial experience in 23 cases

LIU Jian, LIU Rui-qing, CAO Hui-cun, WANG Zhen-yu, CAO Guang-shao, LIU Shi-yi, LI Tian-xiao.

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.05.019

作者单位: 450003 郑州 郑州大学 河南省人民医院介入治疗中心肿瘤及综合病区

通信作者: 李天晓 E-mail: dr.litianxiao@vip.163.com