

· 临床研究 ·

DC-CIK 细胞输注治疗急性髓细胞白血病 50 例分析*

龚奕, 陈幸华[#], 张曦[△], 张诚, 高力, 高蕾, 彭贤贵, 孔佩艳, 王庆余
(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察自体外周血移植联合自身白血病细胞冻融抗原负载的树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)细胞输注治疗急性髓细胞白血病的安全性和临床疗效。方法 50 例初发急性髓细胞白血病患者抽取未缓解的骨髓细胞制备自身白血病细胞冻融抗原,在自体外周血干细胞采集时留取部分单个核细胞培养 DC-CIK 细胞,利用制备好的白血病冻融抗原共培养激活扩增 DC-CIK 细胞。待患者自体外周血造血干细胞移植后 30~60 d 输注自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞,每例每疗程回输细胞总数大于 7×10^9 ,同时给予白细胞介素-2(IL-2)200 万单位皮下注射,每天 1 次,连续 10 d 皮下注射。观察患者接受细胞输注治疗的安全性及临床疗效,并与既往接受自体外周血移植但未输注 DC-CIK 细胞治疗的 52 例急性髓细胞白血病患者在临床疗效方面进行比较分析。结果 接受自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞输注治疗的 50 例患者中,4 例在 DC-CIK 细胞输注过程中出现一过性畏寒发热反应,但最高体温均低于 39°C ($37.8 \sim 38.5^\circ\text{C}$),经物理降温后恢复正常。其他患者均未出现异常不适反应。患者接受 DC-CIK 治疗结束后随访 6~24 个月,总体生存率(OS)、无病生存率(DFS)均高于同期未输注 DC-CIK 细胞治疗的对照组患者,其中随访 24 个月时 OS、DFS 均显著高于未输注 DC-CIK 细胞治疗的对照组患者($P < 0.05$)。结论 对急性髓细胞白血病患者采用自体外周血移植联合自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞输注治疗不良反应小,有助于清除移植后微小残留病和提高患者生存率,提示该治疗方法对急性髓细胞白血病具有良好的治疗应用前景。

关键词: 抗原; 外周血干细胞移植; 白血病, 髓样, 急性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.010

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)30-3039-03

Study on the treatment of auto-hematopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT) combined dendritic cells-cytokine-induced killer cells (DC-CIK cells) pulsed with freeze-thaw leukemia antigen infusions for acute myeloid leukemia*

Gong Yi, Chen Xinghua[#], Zhang Xi[△], Zhang Cheng, Gao Li, Gao Lei, Peng Xiangui, Kong Peiyan, Wang Qingyu
(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the safety and clinical efficacy of auto-hematopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT) combined with infusions of dendritic cells-cytokine-induced killer cells (DC-CIK) pulsed with freeze-thaw leukemia antigen in the treatment of acute myeloid leukemia. **Methods** Fifty patients with acute myeloid leukemia were included in this clinical research. Before transplantation, bone marrow cells were extracted for preparation of freeze-thaw leukemia antigen, and mononuclear cells were collected during harvesting of peripheral hematopoietic stem cells. Dendritic cells were separated from mononuclear cells and pulsed with prepared freeze-thaw leukemia antigen and then co-cultured with mononuclear cells and cytokines to produce DC-CIK cells. Patients were transfused with DC-CIK cells and IL-2 after hematopoietic reconstitution (between +30d and +60d). Therapeutic efficacy and adverse effects were observed. **Results** During treatment with DC-CIK cells, only 4 cases of total 50 patients happened transient fever with body temperature lower than 39°C ($37.8 \sim 38.5^\circ\text{C}$), and no other adverse effects were observed. Elevated percentages of overall survival rates (OS) and disease free survival rates (DFS) were also observed in patients accepted DC-CIK therapy, which demonstrated a significant difference between DC-CIK therapy group and non-DC-CIK therapy group after 24-month follow up (OS: 68.0% vs 50.0%, $P < 0.05$; DFS: 62.0% vs 40.4%, $P < 0.05$). **Conclusion** Auto-hematopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT) combined with infusions of dendritic cells-cytokine-induced killer cells (DC-CIK) pulsed with freeze-thaw leukemia antigen is a safe and effective method, and is worth applying in the treatment of AML.

Key words: antigens; peripheral blood stem cell transplantation; leukemia, myeloid, acute

自体外周血干细胞移植用于治疗急性髓细胞白血病具有移植来源方便、安全性好、适用年龄范围广、所需经费较少等优点,但其致命的缺点是移植后白血病复发率高^[1-2]。移植后复发的主要原因是体内残留白血病细胞清除不彻底^[3]。为解决这一临床问题,临床工作者在急性髓细胞白血病患者自体外周血移植后,输注经过患者自身白血病细胞提呈抗原激活和体外扩增的树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤(DC-CIK)细胞,以

增强对移植后微小残留病的清除,降低自体外周血干细胞移植后白血病复发率,提高个体化治疗效果。

1 资料与方法

1.1 研究对象 以 2007 年 1 月至 2010 年 12 月在本科初诊为急性髓细胞白血病并接受外周血造血干细胞移植的患者为研究对象,其中以未采用 DC-CIK 治疗组 52 例为对照组,采用 DC-CIK 治疗组 50 例为治疗组,两组间性别、年龄相比较差异

无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 试验分组情况(n)

类别	采用 DC-CIK 治疗组	未采用 DC-CIK 治疗组
标本数	50	52
男性	40	36
女性	10	16
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	48.26 \pm 7.78	47.25 \pm 8.54
病理分型		
M1	3	2
M2	26	29
M4	5	9
M5	4	2
M6	12	10

1.2 方法

1.2.1 治疗时机 所有患者明确诊断后进行常规化疗 1~2 个疗程达到完全缓解后再巩固 3 个疗程。对持续完全缓解且无条件进行异基因造血干细胞移植的患者进行自体外周血造血干细胞移植。对照组患者完成移植后进入维持治疗,每 3~4 个月行普通化疗 1 个疗程;治疗组患者造血完全重建后 30~60 d 输注自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞,同时给予患者皮下注射 IL-2 治疗。

1.2.2 自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞的分离扩增 治疗组患者确诊后抽取 30~50 mL 骨髓分离冻存的自身白血病细胞调整细胞密度为 1×10^{11} /L,经 $-80\sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 5 次后以 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤制备冻融抗原。患者于完全缓解期进行外周血干细胞采集时,用细胞分离机留取外周血单个核细胞用于培养 DC-CIK 细胞,参考童春容等^[4]分离、培养 DC-CIK 的方法进行。先将相当于 1×10^6 个白血病细胞制备的冻融抗原按肿瘤细胞与 DC 细胞 1:1 比例共培养后,将收获的 DC 细胞加入到 1×10^6 /L 的患者缓解期分离的单个核细胞中,在干扰素- γ (IFN- γ)、IL-2、IL-1 及 CD3 单克隆抗体条件下培养得到自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞。采用流式细胞仪检测培养细胞表面抗原分子 CD83、CD1a、CD86、CD14 和 HLA-DR 的表达来鉴定 DC 细胞,检测表面抗原分子 CD20、CD3、CD4、CD8、CD56 的表达情况来鉴定和计数 CIK 细胞。

1.2.3 DC-CIK 细胞回输治疗 将经鉴定和质检合格(细菌、真菌培养阴性,细胞活性大于 95%)的 DC-CIK 细胞悬液分 2 次(间隔 24 h)进行回输治疗,每例每疗程回输细胞总数大于 7×10^9 。从 DC-CIK 细胞回输当日开始,给予患者 200 万单位 IL-2 皮下注射,每天 1 次,连续 10 d。

1.2.4 临床疗效评估及不良反应观察 所有患者在治疗中按照新药临床试验要求,密切观察记录生命体征及不良反应发生情况。DC-CIK 细胞输注治疗完成后在不同随访时间段(1、3、6、12、18、24 个月)后进行流式细胞术 MRD 检测、骨髓细胞学及染色体检查,计算各个随访时间段的总体生存率(OS)和无病生存率(DFS)。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 对不同组别间统计数据进行分析 t 检验和 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC-CIK 细胞培养与收获 50 例患者外周血分离的 DC-CIK 细胞均分离培养成功,DC-CIK 细胞表型检测,CD3⁺ (84.38 \pm 2.75)%,CD4⁺ (25.60 \pm 2.36)%,CD8⁺ (73.50 \pm

2.25)%,CD56⁺ (15.14 \pm 2.51)%。收获细胞总量达 10^{11} 以上,能保证临床回输治疗需要。

2.1 临床疗效评价 对接受 DC-CIK 细胞治疗的 50 例患者及未接受 DC-CIK 细胞治疗的 52 例患者进行定期随访,结果见表 2、3。接受 DC-CIK 细胞治疗组随访 3、6、12、18、24 个月时 OS 及 DFS 均高于同期未接受 DC-CIK 治疗组,随访 24 个月时两组间 OS 及 DFS 相比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 采用 DC-CIK 治疗组与未采用 DC-CIK 治疗组 OS 比较[n (%)]

随访时间段	采用 DC-CIK 治疗组 OS	未采用 DC-CIK 治疗组 OS	P^*
3 个月	50/50(100.0)	52/52(100.0)	
6 个月	47/50(92.0)	46/52(88.4)	0.488
12 个月	41/50(82.0)	38/52(73.1)	0.346
18 个月	38/50(76.0)	32/52(61.5)	0.138
24 个月	34/50(68.0)	26/52(50.0)	0.047

*:DC-CIK 治疗组 OS 不同随访时间段与治疗前相比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 采用 DC-CIK 治疗组与未采用 DC-CIK 治疗组 DFS 比较[n (%)]

随访时间段	采用 DC-CIK 治疗组 DFS	未采用 DC-CIK 治疗组 DFS	P^*
3 个月	50/50(100.0)	52/52(100.0)	
6 个月	44/50(88.0)	42/52(80.8)	0.417
12 个月	39/50(78.0)	33/52(63.5)	0.131
18 个月	34/50(68.0)	29/52(55.8)	0.227
24 个月	31/50(62.0)	21/52(40.4)	0.032

*:DC-CIK 治疗组 DFS 不同随访时间段与治疗前相比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 不良反应分析 4 例在 DC-CIK 细胞输注过程中出现过性畏寒、发热反应,但最高体温均低于 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($37.8\sim 38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$),经物理降温后恢复正常。所有患者随访观察至今未出现肝、肾功能异常及其他不适症状。

3 讨论

造血干细胞移植作为急性髓细胞白血病治疗的有效手段已在临床上广泛应用。残留白血病或白血病微小残留病(minimal residual disease,MRD)是造血干细胞移植后疾病复发的关键性障碍之一,也给患者和家属带来巨大的经济和心理压力^[5]。因此,如何采用有效手段清除患者自体外造血干细胞移植后 MRD,对提高移植疗效具有现实意义。

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer,CIK)是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子(如 IL-2、IFN- γ 、IL-1 α 等)共同培养一段时间后获得的一群异质细胞,由于该细胞群同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白,故又被称为 NK 细胞样 T 淋巴细胞,兼有活化的 T 淋巴细胞抗肿瘤活性以及 NK 细胞非 MHC 限制性杀伤肿瘤细胞的优点^[6]。CIK 细胞可在体外大量扩增,并可杀伤自体或异体肿瘤细胞,回输体内后可继续分裂增生而无需外源性细胞因子维持作用,回输治疗不良反应小,显示出良好的发展前景,因而被认为是新一代过继细胞治疗恶性肿瘤的首选方案^[7-8]。DC 是一种专业性抗原

呈递细胞,通过呈递 MHC 限制性肿瘤相关抗原肽激活肿瘤杀伤性 T 细胞在细胞免疫中起重要作用。研究发现,急性白血病细胞抗原诱导的 DC 较未经同一抗原诱导的 DC 更有助于激活体内特异性细胞毒性 T 细胞杀伤活性;同一个体外周血来源的 CIK 和 DC 共同培养后,CIK 的增殖倍数和杀伤肿瘤细胞活性均显著增加^[9-10]。由于急性髓细胞白血病患者接受自体造血干细胞移植后免疫系统功能低下,输注体外诱导活化的 DC-CIK 细胞既激活了抗原负载 DC 的 MHC 限制性抗原呈递、激活特异性 CTL 杀伤效应,又发挥了 CIK 非 MHC 限制性 T 细胞的杀伤作用,为患者体内提供了更多的效应细胞,有助于清除 MRD,降低复发率。本研究中对采用 DC-CIK 与不采用 DC-CIK 治疗的两组患者进行观察发现,采用 DC-CIK 治疗组出院后随访 6~24 个月时,OS 和 DFS 均高于同期不采用 DC-CIK 治疗的对照组,其中随访 24 个月后两组患者 OS 和 DFS 差异有统计学意义($P < 0.05$),证实 DC-CIK 用于治疗 AML 具有提高患者生存和延长无病生存时间等明显优势^[4]。

肿瘤生物治疗与传统的化、放疗方法相比具有不良反应较小、靶向特异性好等优点,并可与化、放疗相结合提高治疗效果,降低复发率。白血病冻融抗原负载 DC-CIK 治疗是一种新型的过继性免疫细胞治疗方法,可在较短时间内获得大量的自体肿瘤的免疫效应细胞。本文通过对 50 例接受自体外周血移植的急性髓细胞白血病患者输注白血病冻融抗原负载 DC-CIK 细胞治疗随访观察提示,对急性髓细胞白血病患者采用自体外周血移植联合自身白血病细胞冻融抗原负载的 DC-CIK 细胞输注治疗不良反应小,能激活自身免疫系统发挥免疫细胞杀伤活性,在清除移植后微小残留病方面疗效明确,提示该治疗手段具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Michallet AS, Chelghoum Y, Thiebaut A, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia in complete remission; the Edouard Herriot Hospital experience[J]. *Hematology*, 2006, 11(3):157-164.
- [2] de Witte T, Hagemeijer A, Suci S, et al. Value of allogeneic versus autologous stem cell transplantation and chemotherapy in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. Final results of a prospective randomized European Intergroup Trial[J]. *Haematologica*, 2010, 95(10):1754-1761.
- [3] Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation[J]. *Leukemia*, 2003, 17(11):2178-2182.
- [4] 童春容, 耿彦彪, 陆道培. 自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗急性白血病的临床研究[J]. *北京医科大学学报*, 2000, 32(5):473-477.
- [5] Freeman SD, Jovanovic JV, Grimwade D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia[J]. *Semin Oncol*, 2008, 35(4):388-400.
- [6] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9):1457-1462.
- [7] Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts[J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(1):78-86.
- [8] Büchler T, Michalek J, Kovarova L, et al. Dendritic cell-based immunotherapy for the treatment of hematological malignancies[J]. *Hematology*, 2003, 8(2):97-104.
- [9] Mohty M, Olive D, Gaugler B. Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts[J]. *Leukemia*, 2002, 16(11):2197-2204.
- [10] Costello RT, Rey J, Fauriat C, et al. New approaches in the immunotherapy of haematological malignancies[J]. *Eur J Haematol*, 2003, 70(5):333-345.

(收稿日期:2011-04-17 修回日期:2011-05-20)

(上接第 3038 页)

- [5] 常综合征骨髓涂片和活检形态学诊断的比较[J]. *上海医学检验杂志*, 2002, 17(5):305-307.
- [6] 张延清, 董家蓄, 王京华, 等. 骨髓活检病理学检测在血液病诊断和鉴别诊断的价值[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2010, 44(4):396-398.
- [7] Moid F, Depalma L. Comparison of relative value of bone marrow aspirates and bone marrow trephine biopsies in the diagnosis of solid tumor metastasis and Hodgkin lymphoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2005, 129(4):497-501.
- [8] Zach O, Ltrrz D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow[J]. *Curt Opin Oncol*, 2006, 18(1):48-56.
- [9] 张谦, 张信国, 谢品浩, 等. 骨髓活检在骨髓转移癌病理诊断中的价值[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(3):551-553.
- [10] 夏大云, 张守勇. 骨髓活检组织切片和骨髓涂片在骨髓转

移性肿瘤中的应用[J]. *临床输血与检验*, 2009, 11(1):80-81.

- [11] 莫东华, 莫汉有, 王晓桃, 等. 100 例骨髓转移癌骨髓组织病理学的观察[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12(10):773-774.
- [12] 林金盈, 任咏薇, 曾维平, 等. 同步对比骨髓活检与涂片在全血细胞减少症鉴别诊断中的作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 12(2):228-230.
- [13] 浦权, 杨梅如. 血液病骨髓诊断病理学[M]. 北京:科学出版社, 2002:181-197.
- [14] 刘瑜, 万楚成, 夏云金, 等. 骨髓活检切片与涂片同步分析对诊断骨髓增生异常/骨髓增殖性疾病意义的探讨[J]. *检验医学*, 2005, 20(6):579-581.

(收稿日期:2011-04-17 修回日期:2011-05-20)