

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0487-03

· 短篇论著 ·

半抗原 DNP 修饰自体肿瘤疫苗治疗恶性黑色素瘤

Hapten dinitrophenyl modified autologous tumor vaccine in treatment of malignant melanoma

杜楠^{1*}, 王希良², 宋林萍¹, 肖文华¹, 孙君重¹, 李秋文¹, 赵晖¹, 康欣荣¹(1. 解放军总医院第一附属医院肿瘤科, 北京 100037; 2. 军事医学科学院五所免疫室, 北京 100081)

[摘要] 目的: 探讨半抗原二硝基氟苯(dinitrophenyl, DNP)修饰自体肿瘤疫苗治疗恶性黑色素瘤的疗效。方法: 32 例Ⅲ期恶性黑色素瘤(恶黑)患者, 肿瘤或淋巴结切除后, 分别采用半抗原 DNP 修饰的自体疫苗和未修饰自体疫苗联合生物化疗进行治疗, 观察两组患者淋巴细胞亚群变化、迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)和临床随访。结果: ①两组比较, 半抗原修饰疫苗组较未修饰疫苗组 CD8⁺-IFN- γ 明显升高($P < 0.05$); 半抗原修饰疫苗组治疗后 CD8⁺-IFN- γ 细胞比例较治疗前明显升高($P < 0.05$), 然而, 半抗原未修饰疫苗组治疗前后变化不大($P > 0.05$)。②半抗原修饰疫苗组患者治疗后 DTH 明显增强, 硬结由(5.4 ± 1.2)mm 增大到(23.5 ± 4.2)mm($P < 0.05$), 半抗原未修饰疫苗组硬结由(6.3 ± 1.4)mm 增大到(11.2 ± 3.2)mm($P < 0.05$), 然而, 两组 DTH 达到阳性结果(≥ 5 mm)的百分比分别为 95% 和 36%($P < 0.01$)。③随访 2 年, 半抗原修饰疫苗组 13 例患者生存时间超过 24 个月, 其中仅 2 例 DTH 阴性; 半抗原未修饰疫苗组 8 例患者生存时间超过 24 个月, 6 例 DTH 阳性。结论: 半抗原 DNP 修饰的自体肿瘤疫苗可增强恶性黑色素瘤患者特异性细胞介导的免疫反应, 从而延长患者生存时间。

[关键词] 恶性黑色素瘤; 二硝基氟苯; 自体肿瘤疫苗; 半抗原; 特异性免疫反应

[中图分类号] R730.5 **[文献标志码]** A

恶性黑色素瘤(恶黑)是一种恶性程度极高、预后很差的皮肤癌。近年来, 其发病率有明显上升趋势, 已成为常见恶性肿瘤。该病对放疗不敏感。然而, 恶黑为免疫原性较高的肿瘤, 因此肿瘤疫苗及免疫因子治疗得到广泛应用^[1], 但其特异性以及免疫反应强度弱, 不能有效地诱导或激活患者免疫反应。

半抗原二硝基氟苯(dinitrophenyl, DNP)修饰的肿瘤疫苗是通过改变树突状细胞(dendritic cells, DCs)表面 MHC 抗原决定簇, 大大增加了肿瘤抗原与 T 细胞反应的结合位点, 使 T 细胞受体发生改变, 产生特异性 T 细胞免疫反应^[2]。2003 年国外该疫苗已经进入Ⅲ期临床研究^[3]。本课题对 32 例Ⅲ期恶性黑色素瘤患者使用半抗原 DNP 修饰的自体肿瘤细胞疫苗进行免疫治疗, 观察患者细胞免疫功能的变化及临床疗效。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2004 年 2 月至 2007 年 4 月 32 例曾在本院治疗的Ⅲ期 b 或 c 恶性黑色素瘤且免疫组化 HMB45 均为阳性的患者志愿参与此研究。其中, 男 20 例, 女 12 例, 23~65 岁。16 例注射半抗原修饰和 16 例注射未修饰的自体恶黑瘤苗。选择患者满足以下条件: (1) 病理诊断为恶性黑色素瘤; (2) 肝肾功能及血常规基本正常; (3) Karnofsky 评分 ≥ 60 分; (4) 预期

生存期超过 3 个月; (5) 与末次放疗或生物治疗的间隔 ≥ 4 个月; 在每次化疗之后 7~10 d 给予疫苗皮内注射; (6) 参照 WHO 标准客观评价疗效; (7) 所有受试者签署知情同意书, 并报医院伦理委员会批准, 依从性好, 便于随访。

1.2 主要试剂

二硝基氟苯购自国药集团化学试剂有限公司, CD8-FITC、CD4-FITC、IFN- γ 单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)为美国 R&D 公司产品, RPMI 1640 培养液、胶原酶和 DNA 酶均为 Sigma 产品, 达卡巴嗪和顺铂为南京制药厂产品, 卡莫司汀为天津金耀氨基酸有限公司, 流式细胞仪为 Coulter 公司产品。

1.3 肿瘤疫苗的制备^[4]

将手术切除的恶黑标本放入生理盐水中, 洗涤 3 次, 无菌层流罩内将肿块切碎至 < 1 mm³ 后, 放入含有胶原酶和 DNA 酶的混合液中, 37℃ 下消化 2~4 h, 离心 2 000 r/min 20 min, 收集肿瘤细胞, 以 Hank's 液洗涤 3 次, 锥虫蓝拒染试验, 活细胞达 80% 以上, 加入冻存剂后, -80℃ 低温冰箱冷冻或

[基金项目] 解放军总医院第一附属医院临床重大创新课题(No. ZD200502)。Supported by the Key Clinic Innovation Program of No. 1 Hospital Affiliated PLA General Hospital (No. ZD200502)

[作者简介] 杜楠(1962-), 男, 河北省石家庄市人, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事临床肿瘤生物治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: dunan05@ yahoo. com. cn

液氮冻存备用。取冻存的细胞,37 °C 快速复苏,以含 10 % 人 AB 血型血清的 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次,悬浮于生理盐水中,每次取细胞(1~5)×10⁶/ml 加入 6 孔板中,再加 0.2% DNP 溶液 100 μl,培养 24 h,然后,经⁶⁰Co 照射 30 Gy,以灭活细胞,备用。

1.4 治疗方法及其效果评估

化学治疗:第 1~4 天采用达卡巴嗪(DTIC) 200 mg/m²;第 1~3 天采用顺铂(PDD) 30 mg/m²;第 1~2 天采用卡莫司汀(BCNU) 125 mg/m²;第 1~7 天采用他莫昔芬 20 mg/m²,至第 21 天重复 1 次为 1 周期,共 6 个周期。生物治疗以 IL-2 和 IFN 为主:IL-2 200 万~400 万单位,静滴;IFN-α 300 万~600 万单位,皮下注射,以上两药隔日交替应用,6~8 周为 1 疗程。每个化疗周期结束后 2~4 d 静脉或局部给予 DC (2~5)×10⁶ 细胞,同时取 1 ml 瘤苗,加入卡介苗 0.1 ml(50 TU/ml),在上臂三角肌处 3 个邻近点皮内注射,共注射 6~8 次。

在半抗原修饰的肿瘤疫苗治疗前 2 d,6 次瘤苗治疗后 1 周,采集患者外周静脉血(抗凝),离心分离单个核细胞,分离外周血淋巴细胞,对外周血淋巴细胞分别行 CD4-FITC、CD8-FITC、IFN-γ^{PE} 单抗标记,进行 FACS 检测。

评估自体肿瘤细胞抗原的特异性迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH),在半抗原修饰的或未修饰的肿瘤疫苗治疗前 2 d 及 4 次瘤苗治疗后 1 周,在患者上肢三角肌处皮内注射瘤苗,观察 48 h 后,通过触诊确定每个反应硬块的边界^[5],用食指腹面触摸边界大小,每个边缘用钢笔标记,每次阳性结果之间距离用 2 色钢笔检测,直径≥5mm 定为阳性反应。评估对自体肿瘤细胞抗原的特异性迟发型超敏(DTH)反应,以 PPD (50 TU/ml)作为非特异性对照,也测量注射后红斑、硬结大小(mm)。

1.5 随访

实施半抗原修饰肿瘤疫苗治疗的患者,每 3~6 个月浅表淋巴结 B 超、胸腹部 CT 扫描或 PET 检查,了解肿瘤有无转移或复发,评价 2 年生存率。

1.6 统计学处理

治疗前、后免疫数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用治疗前后配对 *t* 检验,所有资料均用 SPSS. 10 软件进行统计处理。

2 结果

2.1 瘤苗治疗后患者 CD8⁺ 和 CD4⁺ 细胞的变化

32 例 III 期恶黑患者生物化疗后,联合半抗原瘤苗治疗。在治疗前后,对外周血淋巴细胞分别用

CD8-FITC、CD4-FITC、IFN-γ^{PE} 单抗标记,并用流式细胞术检测。结果显示:半抗原修饰组较未修饰组 CD8⁺-IFN-γ^{PE} 明显升高(*P* < 0.05);然而,半抗原未修饰组治疗前后变化不大(*P* > 0.05, 表 1),提示半抗原修饰瘤苗治疗后,可激发特异性细胞介导的免疫反应。

表 1 半抗原修饰瘤苗治疗后 CD4/CD8-IFN-γ^{PE} 淋巴细胞亚型的变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	治疗前	治疗后	<i>P</i>
半抗原修饰组			
CD8 ⁺ -IFN-γ ^{PE}	3.22 ± 1.42	9.02 ± 2.76	< 0.05
CD4 ⁺ -IFN-γ ^{PE}	4.24 ± 0.89	8.11 ± 2.23	< 0.05
半抗原未修饰组			
CD8 ⁺ -IFN-γ ^{PE}	3.82 ± 1.56	4.31 ± 1.80	> 0.05
CD4 ⁺ -IFN-γ ^{PE}	4.54 ± 1.77	3.87 ± 1.23	> 0.05

2.2 瘤苗治疗前后患者 DTH 的评估

患者 32 例 III 期 b 或 c 恶黑患者接种瘤苗前后,半抗原修饰组和半抗原未修饰组的 DTH 反应均明显增强。半抗原修饰组患者的硬结由(5.4 ± 1.2) mm 增大到(23.5 ± 4.2) mm(*P* < 0.05)。半抗原未修饰组硬结由(6.3 ± 1.4) mm 增大到(11.2 ± 3.2) mm(*P* < 0.05);然而,两组达到阳性结果(≥ 5 mm)的百分比分别为 95% 和 36%(*P* < 0.01)。提示 DNP 修饰肿瘤疫苗明显提高机体对特异性肿瘤原性反应。

表 2 瘤苗治疗前后迟发型超敏反应的比较

组 别	硬结直径(<i>d</i> /mm)		硬结阳性率(%)
	治疗前	治疗后	
半抗原修饰组	5.4 ± 1.2	23.5 ± 4.2	95 ^{**}
半抗原未修饰组	6.3 ± 1.4	11.2 ± 3.2	36

** *P* < 0.01 与半抗原未修饰组比较

2.3 疗效随访

在免疫治疗过程中,所有患者不良反应温和,有良好的耐受,对生活质量无影响;无严重毒性作用发生。随访 24 个月,21 例患者无瘤生存时间超过 24 个月(仍健在),其中半抗原修饰组 13 例患者无瘤生存时间超过 24 个月,仅 2 例 DTH 阴性;半抗原未修饰组 8 例患者生存时间超过 24 个月,6 例 DTH 阳性,其中 2 例因肝转移和 1 例颅内转移死亡。

3 讨论

恶黑属于高度恶性的肿瘤,病死率高,可以发生于身体多个部位。即使是 I 期病变,也有 11% 的患者术后出现局部复发或远处转移。对 III 期患者多采用联合生物化疗方案,虽有一定疗效,但对远期生存影响不大。然而,恶黑为免疫原性较强的肿瘤,其发生机制与机体免疫功能有关。

通常人们采用肿瘤细胞冻融物或基因工程肿瘤抗原多肽作为肿瘤疫苗,然而这些方案在临床的疗效均受到限制,如不同 MHC 的限制性,已知的抗原多肽不能诱导最佳的抗肿瘤免疫反应,针对单一抗原决定簇的 CTL 克隆未必能有效诱导抗肿瘤免疫反应等。

Berd 等^[6]证实 DNP 等半抗原修饰自体肿瘤细胞治疗 214 例 III 期恶黑患者 5 年存活率达到 55%,而未修饰组仅 22%;并且该瘤苗已经进入 III 期临床;单独使用恶黑疫苗仅 14% 患者外周血出现 CTL 反应,而使用半抗原修饰瘤苗 81% 患者出现 CTL 反应。

DTH 是一种过敏原诱发的 T 细胞介导的免疫反应,这些过敏原实际上起到半抗原的作用。Berd 等^[7]发现 DNP 半抗原与 MHC 附着的多肽(抗原)相结合对于形成免疫原性是非常重要的步骤。半抗原 DNP 修饰的细胞进入体内通过两种方式诱导 DNP 特异性 T 细胞反应,一种是直接或旁效应激活 T 细胞,这种反应需要细胞的 MHC 类型匹配的宿主(激活先天性免疫);另一种是半抗原接触肿瘤细胞,通过宿主抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC)提呈 DNP 修饰的肿瘤抗原具有交叉提呈作用。由于肿瘤抗原分子表达许多分子,DNP 修饰的细胞将产生大量半抗原诱发的蛋白,经过 APC(包括树突状细胞 DC)加工,与 MHC I 和 II 类分子形成复合物,在细胞表面产生巨大的沟槽,大大增加了与 T 细胞反应的结合位点。因此,半抗原系统能够有效地诱发肿瘤特异性免疫反应。研究认为^[8],皮肤 DTH 可以作为该免疫疗法的观察指标。通常肿瘤疫苗接近或进入局部淋巴组织才能诱发免疫反应,因此免疫反应的产生常出现局部反应。

许多研究发现,肿瘤疫苗诱导的 T 细胞免疫反应多为较强的免疫原性肿瘤疫苗引起, T 细胞分泌肿瘤特异性 IFN- γ ,导致肿瘤溶解坏死。半抗原修饰主动免疫激活疗法就是使弱免疫原性肿瘤通过半抗原予以修饰,增强其免疫原性,使免疫无效转化为有效的抗瘤反应^[9]。本研究对 32 例恶黑患者给予

自体肿瘤疫苗主动免疫治疗,治疗后,CD8⁺ IFN- γ 双阳性细胞比例明显升高($P < 0.05$),尤其是 DNP 半抗原修饰组较未修饰组 CD8⁺ IFN- γ 双阳性细胞比例升高更为明显,提示自体肿瘤疫苗可引起特异性细胞免疫反应。

采用半抗原修饰肿瘤疫苗治疗恶黑后,患者中位生存时间和 2 年生存率明显优于半抗原未修饰组。DNP 修饰的肿瘤疫苗对增强宿主特异性迟发型过敏反应、活化抗原提呈细胞、增强 CTL 活性、引起强大的免疫反应有重要作用。本研究表明,DTH 反应强度与 CD8⁺ -IFN- γ ⁺ 双阳性细胞比例的升高呈现一致性^[10]。因此,恶黑患者经半抗原修饰的肿瘤疫苗治疗可使特异性细胞免疫功能增强,可能在杀灭残留癌细胞、阻抑肿瘤复发、提高远期疗效有一定作用,可能成为治疗恶黑患者的重要手段。

[参考文献]

- [1] 杜楠,李留树,肖文华,等. 恶性黑色素瘤生物化疗的临床研究初探[J]. 解放军医学杂志,2007,32(3):253-255.
- [2] Berd D. Contribution of dead cells to the immunogenicity of an autologous, hapten-modified melanoma vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(7-8): 795-797.
- [3] Holzer AM, Kaplan LL, Levis WR. Haptens as drugs: contact allergens are powerful topical immunomodulators[J]. J Drugs Dermatol, 2006, 5(5): 410-416.
- [4] 杜楠,李留树,肖文华,等. 半抗原修饰的黑色素瘤细胞激活树突状细胞诱导特异性 T 细胞反应[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(3): 221-223.
- [5] Berd D. M-Vax: an autologous, hapten-modified vaccine for human cancer[J]. Expert Rev Vaccines, 2004, 3(5): 521-527.
- [6] Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, et al. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(3): 403-415.
- [7] Manne J, Mastrangelo MJ, Sato T. TCR rearrangement in lymphocytes infiltrating melanoma metastases after administration of autologous dinitrophenyl-modified vaccine[J]. J Immunol, 2002, 169(6): 3407-3412.
- [8] Quillien V, Lesimple T, Toujas L. Vaccinal cell therapy in melanoma[J]. Bull Cancer, 2003, 90(8-9): 722-733.
- [9] Palma E, Cho MJ. Improved systemic pharmacokinetics, biodistribution, and antitumor activity of CpG oligodeoxynucleotides complexed to endogenous antibodies *in vivo*[J]. J Control Release, 2007, 120(1-2): 95-103.
- [10] Kumamoto T, Huang EK, Paek HJ, et al. Induction of tumor-specific protective immunity by *in situ* langerhans cell vaccine[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(1): 64-69.

[收稿日期] 2007-04-24

[修回日期] 2007-08-20

[本文编辑] 郁晓路