

# 冷冻消融联合 DC-CIK 免疫疗法治疗 转移性肝细胞癌回顾性分析

龙新安 姚飞 曾健滢 汪媛 李家亮 陈继冰 穆峰 牛立志 徐克成

**【摘要】** 目的 对转移性肝癌患者冷冻消融联合 DC-CIK 免疫治疗疗效进行回顾性分析。方法 45 例转移性肝癌患者, 根据治疗方式分为冷冻联合 DC-CIK 治疗组 (21 例), 冷冻治疗组 (12 例), DC-CIK 治疗组 (5 例) 和未治疗组 (7 例)。对各组患者进行随访, 分析各组患者总体生存期。结果 各组患者中位生存时间分别为: 冷冻联合 DC-CIK 治疗组 32 个月, 冷冻治疗组 17.5 个月, DC-CIK 治疗组 4 个月, 未治疗组 3 个月, 冷冻联合 DC-CIK 治疗组患者总体生存期显著长于未治疗组、冷冻组和 DC-CIK 治疗组。结论 冷冻联合 DC-CIK 免疫治疗显著延长转移性肝癌患者总体生存期。

**【关键词】** 冷冻外科手术; DC-CIK; 免疫疗法; 转移性肝癌

**Combination treatment with comprehensive cryoablation and immunotherapy in metastatic hepatocellular cancer** Long Xin'an, Yao Fei, Zeng Jianying, Wang Yuan, Li Jialiang, Chen Jibing, Mu Feng, Niu Lizhi, Xu Kecheng. The Fifth Department of Oncology, Fuda Cancer Hospital Affiliated to Medical College of Jinan University, Guangzhou 510665, China

Corresponding author: Chen Jibing, Email: fudaclub@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To retrospectively assess the effect of comprehensive cryosurgery (ablation of intra- and extrahepatic tumors) plus dendritic cell-cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic hepatocellular cancer. **Methods** 45 patients were enrolled and divided into four groups based on their treatment method: cryo-immunotherapy (21 patients), cryotherapy ( $n=12$ ), immunotherapy ( $n=5$ ) and untreated ( $n=7$ ) groups. Overall survival (OS) of these 4 groups metastatic hepatocellular cancer patients was assessed after an 8-year follow-up. **Results** Median OS was higher following cryo-immunotherapy (32 months) or cryotherapy (17.5 months;  $P<0.05$ ) than in the untreated group (3 months) and was higher in the cryo-immunotherapy group than in the cryotherapy group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Cryotherapy and, especially, cryo-immunotherapy significantly increased OS in metastatic hepatocellular cancer patients.

**【Key words】** Cryosurgery; Dendritic cell-cytokine-induced killer cell; Immunotherapy; Metastatic hepatocellular

我国是原发性肝癌高发的国家, 肝癌病死率占恶性肿瘤的第二位<sup>[1]</sup>。由于伴随有其他慢性肝病 (肝炎、肝硬化等) 和肝外疾病等因素的影响, 80% 肝癌患者不适合接受肿瘤切除手术<sup>[2-3]</sup>。近年来, 微创外科和肿瘤局部治疗的兴起为肝癌治疗开辟了新的方向。其中, 氩氦刀冷冻治疗具有微创, 对肝脏功能影响小, 对大血管损伤轻微, 可在 CT 监视下精确消融以及可激活抗肿瘤免疫, 增强机体免疫力及

延长生存期等优点, 已经逐渐成为无法切除中晚期肝癌的一种治疗选择<sup>[4-5]</sup>。冷冻治疗在肿瘤原位对肿瘤组织进行冷消融, 肿瘤坏死凋亡后会释放大量肿瘤相关抗原入血, 从而诱发冷冻免疫反应。临床的研究发现, 冷冻引发抗肿瘤免疫, 可能是免疫促进也可能是免疫抑制, 其冷冻免疫的具体机制仍需深入研究<sup>[6]</sup>。树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是有效的专职抗原提呈细胞, 成熟的 DC 可以通过 II 型组织相容性抗原 (MHC-II) 等途径提呈肿瘤抗原, 可有效抵制肿瘤细胞的免疫逃逸。细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killers, CIK) 是一类抗肿瘤抗病毒效应细胞, 能在体外被诱导并大量增殖。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.04.007

作者单位: 510665 广州, 暨南大学医学院附属复大肿瘤医院肿瘤  
外科

通讯作者: 陈继冰, Email: fudaclub@gmail.com

因此,利用冷冻消融释放肿瘤抗原,利用DC来提呈抗原,利用CIK来杀伤肿瘤,可能是减少肿瘤复发,延长患者生命的一种有效的方法。因此,本研究对转移性肝癌患者全面冷冻消融联合DC-CIK(dendritic cell-cytokine-induced killer)免疫治疗进行初步回顾性分析,以评估该联合治疗的临床价值。

### 资料与方法

1. 研究方案:本研究为回顾性调查研究,其目的对转移性肝癌患者冷冻消融联合DC-CIK免疫治疗疗效进行性分析。本研究经广州复大肿瘤医院伦理委员会的批准,并在伦理委员会指导下进行。

2. 入组标准:统计2004年1月至2011年10月间45例来广州复大肿瘤医院接受治疗转移性肝癌患者。入组患者均在肝脏有单一肿瘤并主动放弃手术,化疗。冷冻消融的入组标准:KPS评分 $\geq 70$ ,血小板计数 $\geq 80 \times 10^9/L$ ,白细胞计数 $\geq 3 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞计数 $\geq 2 \times 10^9/L$ ,血红蛋白水平 $\geq 90 g/L$ ,凝血酶原时间国际标准化比值 $\geq 1.5$ ,肝脏肿瘤没有明显侵犯胆囊、膈肌或大血管,没有3级高血压病、严重的冠状动脉疾病、骨髓抑制、呼吸系统疾病和急性和慢性感染等上述情况;良好的肝功能(胆红素 $< 30 \mu mol/L$ ,转氨酶 $< 60 U/L$ ,Child-Pugh分级的得分A或B)、肾功能(血清肌酐 $< 130 \mu mol/L$ ,血清尿素 $< 10 mmol/L$ )。

3. 患者一般情况:入组患者中,33例患者接受冷冻消融治疗,5例患者接受单纯免疫治疗,7例患者未治疗。33例患者接受冷冻消融治疗患者中,25例患者肿瘤大于5cm,在冷冻治疗前接受动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)治疗,在所有接受冷冻治疗的患者中,12例患者单纯进行冷冻治疗,21例患者接受冷冻同时接受免疫治疗。患者一般情况见表1。

4. TACE:患者均采用Seldinger技术穿刺股动脉,置入5.0或4.0导管于肝固有动脉或肝左右动脉或其他载瘤动脉支进行肝动脉化疗栓塞。用药方

案:阿霉素(50 mg),丝裂霉素(10 mg),超液化碘油5~20 ml,患者治疗前后均应用5-羟色胺镇吐治疗,同时行保肝、对症治疗,如果肿瘤在上述治疗过程2周后无缩小,患者需要进行第2次TACE。

5. 冷冻消融:手术使用美国Endocare公司氩氦刀冷冻外科系统(CRYO-20型)和直径为3 mm或5 mm的冷冻探针(CRYO-42型)。在超声引导下将冷冻探针插入肿瘤中心,CT扫描确定到位后,开启氩氦刀冷冻外科系统输入氩气,探针针尖冷冻温度迅速降至 $-180^\circ C$ ,冰球形成并覆盖肿瘤,超声声像图表现为低回声区域,并根据冰球大小确定冷冻时间。最大持续冷冻时间一般为15 min,氩气停输后改输氦气复温5 min,为一个冷冻-复温循环。术中要求冷冻范围超过肿瘤边缘1 cm,待两次循环结束后复查超声。术后往针道注射1 ml纤维蛋白原确保止血。

6. DC-CIK细胞免疫治疗:26例患者选择免疫疗法(连续4次DC-CIK细胞)。患者冷冻前2 d抽取患者70 ml的外周静脉血,经离心后获得外周血单核细胞,加入细胞因子定向诱导成CIK和DC,用自体肿瘤抗原(Ag)在培养的第5天负载DC,第8天将DC与CIK细胞共同培养。至DC-CIK细胞数量达到 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.3 \times 10^{10}$ 开始回输。回输前先静脉滴注生理盐水,然后连接含1%人白蛋白的生理盐水200 ml制成的细胞悬液回输细胞,细胞采用输血器回输,1 h内输完,隔天1次,共5次,每疗程回输细胞总数 $> 5 \times 10^9$ 。

7. 随访:在原发病灶和转移灶进行微创治疗后的1 d和1周后进行胸部的和(或)腹部的超声探查。术后1个月以及之后每间隔3~4个月进行后续的动态CT检查。患者生存期从入组患者确诊为转移性肝癌之日算起,到死亡之日截止。

8. 统计学分析:采用美国San Diego公司GraphPad软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 表示差

表1 入组患者一般临床资料

组别	例数	年龄[岁,中位数(范围)]	肿瘤直径[cm,中位数(范围)]	转移灶部位(例)		
				肺	骨	其他
冷冻联合免疫治疗组	12	57.2(39~79)	4.4(2.3~8.4)	5	3	5
冷冻治疗组	21	55.5(37~72)	4.4(2.5~7.8)	8	5	10
免疫治疗组	5	54(45~63)	4.6(3.1~9.2)	4	0	3
未治疗组	7	49(36~75)	3.7(2.7~6.8)	6	1	1

异显著。采用 Dunnet *t* test 比较冷冻联合 DC-CIK 治疗组、冷冻治疗组、DC-CIK 治疗组与化疗组之间患者总体生存期差异；采用卡普兰-梅耶 (Kaplan-Meier) 检验和对数秩 (Log-rank) 分析对两组间的 OS 进行对比。

## 结 果

1. 术后不良反应观察：全部患者冷冻术均顺利完成，术后未见严重并发症，如肝破裂和肝衰竭及肌红蛋白尿所致的肾衰竭等严重并发症。冷冻消融术后 6 例 (18%) 患者出现轻度的肝出血，在使用止血药物后 5 d 内全部恢复。1 例 (3%) 发生肝包膜破裂，经输血治疗后恢复。7 例 (21%) 在冷冻消融治疗后 1 周内发生短暂性血小板减少，其中 2 例接受输注血小板治疗。2 例 (6%) 患者的肿瘤在肝右叶近膈顶部位，治疗后出现无症状性右侧胸腔积液，但均在 2~3 周内自行消失。2 例 (6%) 在前述部位的肝脏肿瘤分别在冷冻后的第 2、4 天出现肝脓肿，予以抗生素及引流处理后恢复。4 例出现轻度发热 (体温不超过 39 °C)。围手术期未发现明显的 TACE 相关的不良反应。在联合冷冻治疗后第 1~2 周，13 例 (76%) 术前伴随腹痛的患者，术后 VAS 疼痛评分减至 0~3 分，止痛药剂量减少 50%，KPS 评分增加 ≥20 分。

2. 治疗方法和频率对患者的 OS 的影响：在本次研究中，25 例患者的肝脏肿瘤长径 ≥5 cm，其首选治疗方法是肝动脉栓塞化疗 (TACE)，接受过 TACE 冷冻消融的患者，其中位 OS 为 29 个月，而单纯接受冷冻治疗的为 26 个月，结果显示两组患者 OS 无差异 (Chi square=0.063 5,  $P=0.797$  9) (图 1A)。也就是说，一个较大的肝肿瘤通过冷冻治疗成功缩小，术前是否行 TACE 治疗对患者总体生存期未有显著影响。因此，将两组数据合并，统一入组为冷冻治疗组。在 33 例接受冷冻消融患者中，21 例患者单纯进行冷冻治疗，12 例患者接受冷冻同时接受免疫治疗。比较两组生存结果后发现，冷冻联合免疫治疗组、冷冻治疗组的中位 OS 分别为 32 和 17.5 个月，而单纯进行免疫治疗和未治疗组患者中位生存时间仅为 4 和 3 个月。冷冻联合 DC-CIK 组 OS 显著长于未治疗组 ( $q=4.735$ ,  $P<0.001$ )，冷组 OS 长于未治疗组 ( $q=2.496$ ,  $P<0.05$ ) (图 1B)；而冷冻联合免疫治疗组 OS 长于冷冻组 (Chi square=5.055,  $P=0.024$ ) (图 2)。

## 讨 论

我国是原发性肝癌高发的国家，肝癌病死率占恶性肿瘤的第二位<sup>[1]</sup>。近年来，射频消融、微波消融、冷冻消融等在肝癌临床领域逐渐开展，微创外科和肿瘤局部治疗成为不可切除的肝癌的一种可以选择的治疗手段。由于具有微创，对肝脏功能影响小，重复性强，且有减少肿瘤残留和转移，增强机体免疫力及延长生存期等优势，氩氦刀冷冻治疗已经逐渐成为无法切除的中晚期肝癌治疗的一种选择<sup>[4-5,7]</sup>。由于一次性冷冻面积过大会增加消融并发症的发生，对于直径大于 5 cm 的肿瘤，冷冻前的 TACE 可减轻冷冻的不良反应<sup>[8]</sup>。有研究报道结果显示：对于体积中等至较大的肿瘤进行冷冻消融和 (或) 动脉栓塞治疗，5 年生存率为 23%，局部进展率为 24%<sup>[9-10]</sup>。Shibata 等<sup>[11]</sup>认为，对于大肝癌的治疗，冷冻消融前应用 TACE 比单独应用 TACE 或冷冻消融治疗能取得更好的疗效。因此，本次研究通过单次或多次的 TACE，我们可以先将大肝癌直径缩小至 5 cm 以内，之后再通过联合应用多针的冷冻治疗将其完全消融。从目前的治疗结果来看，患者生存时间和小肝癌没有统计学差异。冷冻虽然是微创手术，但冷冻消融也可能存在一定的风险。娴熟的操作和严格的病例选择可以有效防止发生严重并发症 (如肝裂破坏与肌红蛋白尿性急性肾衰竭)，减少副作用的概率 (如肝出血，肝包膜破裂，血小板减少和肝脓肿)，并为进一步治疗提供保证。从本次研究的结果来看，氩氦刀冷冻并发症相对轻微，患者耐受度较好。

目前，免疫治疗肝细胞肝癌的临床应用逐渐增多。其中，以 DC 为基础的免疫治疗也逐渐应用在临床中。DC 是有效的专职抗原提呈细胞，成熟的 DC 可以通过 II 型组织相容性抗原 (MHC-II) 等途径提呈肿瘤抗原，可有效抵制肿瘤细胞的免疫逃逸。DC 常常被负载于从以下物质来源的合成多肽：已知的肿瘤抗原<sup>[12]</sup>、肿瘤细胞裂解物<sup>[13]</sup>、凋亡的肿瘤细胞<sup>[14]</sup>、肿瘤抗原的 DNA<sup>[15]</sup>、整个肿瘤细胞的 DNA<sup>[16]</sup>或 RNA 转染<sup>[17]</sup>。此外，DC 也可与肿瘤细胞融合，以诱导抗原特异性和多克隆细胞毒性的 T 淋巴细胞反应<sup>[18]</sup>。免疫治疗可以作为一种有效的肿瘤治疗手段，但同时存在一些困难需要去克服：由于肿瘤的各类器官结构，其对免疫细胞非常排斥，会导致局部的免疫耐受和免疫监视逃逸<sup>[19]</sup>。DC 和 CIK 的过继转移治疗对那些肿瘤负荷较轻或作为一

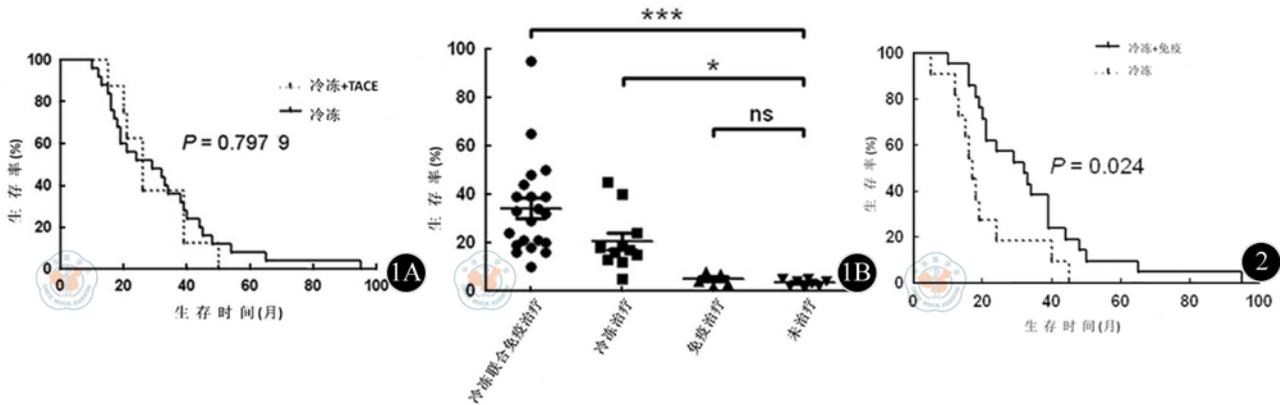


图1 总生存期(OS)与治疗类型的相关性。1A: 冷冻消融是/否联合动脉化疗栓塞(TACE)的患者中位OS; 1B: 冷冻治疗和(或)联合免疫治疗组与未治疗组对比。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns为无统计学差异 图2 患者进行全面冷冻术是/否联合免疫治疗的总生存期。冷冻-免疫组(21例)和冷冻治疗组(12例)患者的OS对比

种辅助治疗手段, 治疗效果较好; 对于肿瘤负荷较大的肿瘤, 免疫治疗前冷冻消融的减瘤作用是非常重要的。因此, 本次研究对转移性肝癌联合冷冻和DC-CIK 免疫治疗, 利用冷冻消融进行减瘤, 同时肿瘤原位坏死, 释放抗原, 利用 DC 来提呈抗原, 利用 CIK 来杀伤肿瘤, 以寻找到减少肿瘤复发, 延长患者生命的一种有效的方法。本次研究显示, 联合冷冻免疫治疗能使转移性肝癌患者 OS 从 3 个月延长至 32 个月(图 1B)。冷冻-免疫治疗组的 OS 要显著长于单纯冷冻治疗组、单纯免疫治疗组和放弃治疗组。因此, 从目前的研究来看, 冷冻联合 DC-CIK 免疫治疗存在协同作用, 可延长患者生存时间(图 2)。

综上, 本次研究对晚期肝细胞癌冷冻消融和 DC-CIK 免疫联合治疗进行回顾性分析, 研究发现冷冻联合 DC-CIK 治疗组患者总体生存期显著长于未治疗组、冷冻组和 DC-CIK 治疗组。冷冻联合 DC-CIK 免疫治疗显著延长转移性肝癌患者总体生存期。由于本回顾性分析临床样本量不足, 还需要扩大样本并进行深入分析以明确冷冻联合 DC-CIK 免疫治疗的临床价值。

参 考 文 献

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.  
 [2] Johnson PJ. Hepatocellular carcinoma: is current therapy really altering outcome?[J]. Gut, 2002, 51(4): 459-462.  
 [3] Dusheiko GM, Hobbs KE, Dick R, et al. Treatment of small hepatocellular carcinomas[J]. Lancet, 1992, 340(8814): 285-288.  
 [4] Ng KK, Lam CM, Poon RT, et al. Comparison of systemic responses of radiofrequency ablation, cryotherapy, and surgical resection in a porcine liver model[J]. Ann Surg Oncol, 2004, 11(7): 650-657.  
 [5] Gage AA, Baust JG. Cryosurgery for tumors[J]. J Am Coll Surg, 2007, 205(2): 342-356.

[6] Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses[J]. Cryobiology, 2009, 58(1): 1-11.  
 [7] Mu F, Niu L, Li H, et al. Percutaneous comprehensive cryoablation for metastatic hepatocellular cancer[J]. Cryobiology, 2013, 66(1): 76-80.  
 [8] Xu KC, Niu LZ, Zhou Q, et al. Sequential use of transarterial chemoembolization and percutaneous cryosurgery for hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(29): 3664-3669.  
 [9] Orlacchio A, Bazzocchi G, Pastorelli D, et al. Percutaneous cryoablation of small hepatocellular carcinoma with US guidance and CT monitoring: initial experience[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2008, 31(3): 587-594.  
 [10] Shimizu T, Sakuhara Y, Abo D, et al. Outcome of MR-guided percutaneous cryoablation for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2009, 16(6): 816-823.  
 [11] Shibata T, Isoda H, Hirokawa Y, et al. Small hepatocellular carcinoma: is radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization more effective than radiofrequency ablation alone for treatment? [J]. Radiology, 2009, 252(3): 905-913.  
 [12] Akizuki S, Magara T, Tanaka T. Diminution of the number of gamma delta T lymphocytes in hepatocellular carcinoma patients treated with transcatheter arterial embolization[J]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 1998, 21(3): 108-117.  
 [13] Ayaru L, Pereira SP, Alisa A, et al. Unmasking of alpha-fetoprotein-specific CD4(+) T cell responses in hepatocellular carcinoma patients undergoing embolization[J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1914-1922.  
 [14] Nestle FO, Aljagic 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.  
 [15] Mackensen A, Herbst B, Chen JL, et al. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells[J]. Int J Cancer, 2000, 86(3): 385-392.  
 [16] Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity[J]. J Immunother, 2006, 29(5): 545-557.

- [17] Nair SK, Boczkowski D, Morse M, et al. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(4): 364-369.
- [18] Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects[J]. Vaccine, 1999, 18(9/10): 765-777.
- [19] Plate J. Clinical trials of vaccines for immunotherapy in pancreatic cancer[J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(6): 825-836.

(收稿日期: 2013-12-16)

(本文编辑: 马超)

龙新安, 姚飞, 曾健滢, 等. 冷冻消融联合 DC-CIK 免疫疗法治疗转移性肝细胞癌回顾性分析 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (4): 600-604.