

· 论 著 ·

HER-2 多肽负载自体树突状细胞治疗 HER-2 阳性乳腺癌的初步研究

杜庆安¹, 丁蓉蓉², 蔡 凯³, 江龙委³

[摘要] **目的** 探讨 HER-2 多肽负载自体树突状细胞治疗 HER-2 阳性乳腺癌的安全性和有效性。**方法** 15 例 HER-2 阳性及 HLA-A2 阳性的乳腺癌患者(Ⅱ~Ⅲ期)经标准治疗行 HER-2 多肽负载自体树突状细胞治疗。检测治疗前后患者外周血淋巴细胞亚群、Th1 型和 Th2 型细胞因子水平,以及 IFN- γ 分泌型 CD8⁺T 淋巴细胞比例,观察治疗相关毒副反应及近期临床疗效。**结果** 治疗后外周血 CD3⁺ 比例、CD3⁺CD4⁺ 比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前明显升高($P < 0.05$),治疗后血清中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 较治疗前明显上升($P < 0.05$),IL-4、IL-10、IL-12 无明显变化($P > 0.05$),IL-10/TNF- α 比值较治疗前显著下降($P < 0.05$)。IFN- γ 分泌型 CD8⁺T 淋巴细胞比例较治疗前也显著上升($P < 0.05$)。在治疗结束后的随访时间内,15 例患者取得了 13 例病情稳定,2 例病情进展的近期临床疗效。所有治疗患者均未出现 3~4 级不良反应。**结论** HER-2 阳性乳腺癌行 HER-2 多肽负载自体树突状细胞治疗是安全可行的,可改善患者细胞免疫功能并提高 Th1 型细胞因子水平,促进特异性抗肿瘤细胞免疫应答并产生一定临床获益。

[关键词] 乳腺癌;树突状细胞;多肽;免疫治疗

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.06.009

The primary effect of vaccination with autologous dendritic cells loaded with Her-2 peptides against Her-2 positive breast cancer

DU Qing-an¹, DING Rong-rong², CAI Kai³, JIANG Long-wei³. 1. Department of Burn and Plastic Surgery, 2. Department of Outpatients Service, 3. Department of Tumor Biological Therapy, 81 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To investigate the safety and efficacy of vaccination with autologous dendritic cells loaded with Her-2 peptides against Her-2 positive breast cancer after standard therapy. **Methods** Fifteen HLA-A2 positive and Her-2 positive breast cancer patients (stage II and III) after standard therapy were treated with autologous dendritic cell loaded with Her-2 HLA-A2-restricted peptides. The peripheral blood lymphocyte subsets, Th1 type cytokines (IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ) and Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) level in serum, and the blood IFN- γ + CD8⁺T ratio were examined. **Results** The percentage of CD3⁺ and CD3⁺CD4⁺ and ratio of CD4⁺/CD8⁺ increased significantly ($P < 0.05$) after the vaccination. Serum levels of IL-2, TNF- α and IFN- γ increased significantly ($P < 0.05$) after treatment, while serum levels of IL-4, IL-10, and IL-12 showed no obvious change ($P > 0.05$). The IL-10/TNF- α ratio decreased significantly ($P < 0.05$) after the vaccination. The IFN- γ + CD8⁺T cells also increased significantly ($P < 0.05$) after the vaccination. No grade 3~4 adverse event happened in all cases during treatment. **Conclusion** Vaccination with autologous dendritic cells loaded with Her-2 peptides against Her-2 positive breast cancer after standard therapy is safe and feasible. This treatment could improve the body's cellular immune function and elicit Th1 immune responses. The increased tumor special cellular immune responses could produce clinical benefits to some degree.

[Key words] breast cancer; dendritic cells; peptides; immunotherapy

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一,我国乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤首位,死亡率为女性恶性肿瘤死因的第 6 位^[1-2]。人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 是一种具有酪氨酸激酶活性的癌基因,HER-2 基因扩增/过表达是乳腺癌复发和存活的独立预后因

素,约 20%~30% 的乳腺癌为 HER-2 阳性,HER-2 阳性乳腺癌预后较差^[3]。尽管针对 HER-2 基因的分子靶向药物如曲妥珠单抗疗效显著,但同样存在一些问题和挑战,如治疗时间的长短、耐药的产生以及心脏毒性等等;且由于价格昂贵,影响了临床广泛使用。免疫靶向 HER-2 的研究近年来引起广泛兴趣,既有靶向 HER-2 的 DNA 核酸、肽及蛋白疫苗,也有 HER-2 特异性细胞毒 T 淋巴细胞的过继免疫治疗^[4]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最

作者单位: 210002 江苏南京,解放军 81 医院,1. 烧伤整形科,2. 门诊部,3. 肿瘤生物治疗科
通讯作者: 蔡 凯, E-mail: njcaikai@163.com

强的抗原递呈细胞,是启动、调控并维持免疫应答的中心环节^[5-7],DC 作为载体负载靶向 HER-2 的核酸、多肽或蛋白具有明显活性优势。现将 2011 年 6 月-2012 年 12 月 15 例经标准治疗后的 HLA-A2 阳性、HER-2 阳性的 II ~ III 期乳腺癌患者在我院行 HER-2 多肽负载 DC 治疗的初步结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料 本研究根据 2003 年国家食品药品监督管理局颁布的《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》的要求进行,经医院伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。病例入选标准:年龄在 18 ~ 75 岁之间;功能状态评分 ≥ 70 分;病理证实为乳腺癌且 HER-2 阳性(免疫组化为 +++ 或荧光原位杂交证实);HLA-A2 阳性(流式细胞术证实);已按乳腺癌临床实践指南(NCCN 指南中国版)进行治疗;先前治疗结束至首次 DC 治疗至少间隔 4 周以上;无自身免疫疾病。排除标准:怀孕或哺乳期妇女;脏器移植者;严重的不可控制的感染,不签署及不理解知情同意者。15 例入选患者按美国癌症联合委员会(AJCC)乳腺癌 TNM 分期标准(第七版)进行分期,II 期 5 例,III 期 10 例,年龄 42 ~ 68 岁,平均年龄 56 岁。

1.2 材料与方法 白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-1 α (interleukin-4, IL-1 α)、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)、干扰素- γ (interferon, IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)均为 PeproTech 产品,CD3 单抗为古巴分子免疫学中心产品,Ficoll 分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,无血清培养基 X-VIVO 为 Lonza 公司产品,内毒素检测试剂盒购自湛江博康公司,流式抗体试剂为 BD 公司产品,细胞因子 ELISA 试剂盒为 R&D Systems 公司产品。HLA-A2 限制性 HER-2 多肽(KIFGSLAFL 和 IISAVVGIL)由上海吉尔生化有限公司合成。血细胞分离机(COM. TEC)为费森尤斯卡比公司产品。

1.3 细胞制备及治疗计划

1.3.1 DC 体外诱导 血细胞分离机采集患者外周单个核细胞约 80 ml, Ficoll 分离后重悬于细胞培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后,洗去未贴壁细胞。培养瓶内加入含 100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4 的 X-VIVO 培养基,第 3 天进行 1/3 换液,第 6 天收获未成熟 DC,用 X-VIVO 培养基重悬,

调整浓度为 $(2 \sim 3) \times 10^6$ /ml,加入终浓度为 100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4、20 ng/ml TNF- α 培养 24 h,加入 10 μ g/ml HER-2 多肽继续诱导 24 h,收获成熟 DC。通过形态学、表面标记等进行鉴定,按《中华人民共和国药典》2010 版第三部规定的方法进行内毒素和无菌检测,合格后方可回输,同时留样备查。

1.3.2 治疗计划 DC 每周回输 1 次, $(1 \sim 3) \times 10^7$ 细胞/次,共 4 次。细胞重悬于 2 ml 的生理盐水中,在淋巴结富集区的锁骨、腋窝结、腹股沟多点注射。

1.4 免疫指标的检测 第一次 DC 治疗前 2 天和最后一次 DC 治疗后 1 个月,流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群及 IFN- γ 分泌型 CD8⁺ T 细胞(IFN- γ + CD8⁺ T 细胞)比例,ELISA 法检测血清 Th1 型细胞因子(IL-2、IL-12、TNF- α 、INF- γ)和 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10)。

1.5 随访及近期临床疗效观察 随访时间从 2011 年 6 月-2013 年 5 月。最后一次 DC 治疗后 1 个月复查血常规、肝肾功能、外周血细胞因子和淋巴细胞亚群,并行影像学检查(CT、MRI 或 ECT 检查),进行免疫反应和临床疗效评价。近期疗效评估按实体瘤疗效评价标准分为完全缓解、部分缓解、病情稳定和疾病进展^[8]。治疗过程中,根据 NCI 毒性标准观察患者是否出现不良反应^[9]。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验(正态分布时)或者 Wilcoxon 秩和检验(非正态分布时)。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后外周血细胞亚群变化 DC 治疗后外周血 CD3⁺ 比例、CD3⁺ CD4⁺ 比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前明显升高(*P* < 0.05),CD3⁺ CD8⁺ 比例、NK 细胞比例无明显变化(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 细胞因子水平的变化 患者治疗前后 Th1 型细胞因子(IL-2、IL-12、TNF- α 、INF- γ)和 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10)变化见表 2。与治疗前比较,疗后血清 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 显著提高(*P* < 0.05 或 0.01),IFN- γ 升高最为显著(*P* < 0.01)。Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10)治疗前后无明显变化(*P* > 0.05)。IL-10/TNF- α 比值治疗后显著降低(*P* < 0.05)。

2.3 IFN- γ + CD8⁺ T 细胞比例比较 DC 治疗后患者外周血 IFN- γ + CD8⁺ T 细胞比例与治疗前相比显著提高(*P* < 0.01),其中 6 例患者治疗后 IFN- γ + CD8⁺ T 细胞比例升高 3 倍以上(图 1、图 2)。

表 1 治疗前后 T 淋巴细胞亚群变化 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

时间	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK (%)
治疗前	58.23 ± 6.20	29.38 ± 5.19	28.49 ± 5.56	1.08 ± 0.33	11.83 ± 4.84
治疗后	71.69 ± 8.41 *	40.20 ± 5.02 *	30.39 ± 5.12	1.36 ± 0.38 *	14.64 ± 4.95

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$

表 2 治疗前后细胞因子变化 (pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 15$)

时间	IL-2	IL-12	TNF- α	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-10/TNF- α
治疗前	38.4 ± 9.7	54.7 ± 17.4	30.6 ± 12.3	17.75 ± 5.3	26.9 ± 7.2	21.1 ± 5.7	0.81 ± 0.48
治疗后	79.5 ± 17.1 **	65.1 ± 22.5	44.7 ± 13.8 *	55.2 ± 18.7 **	31.2 ± 10.3	18.6 ± 5.0	0.45 ± 0.19 *
平均升高倍数	2.2 ± 0.9	1.2 ± 0.4	1.75 ± 0.9	3.5 ± 2.4	1.3 ± 0.8	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.4

注:与治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

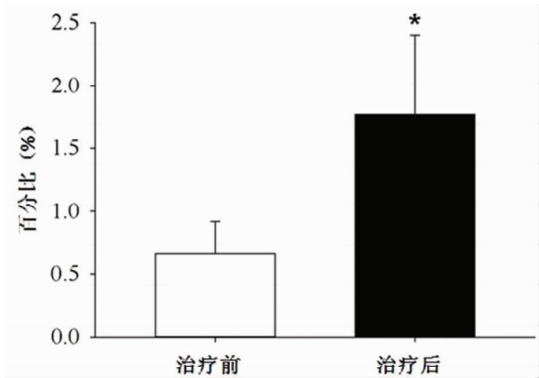


图 1 治疗前后外周血 IFN- γ + CD8⁺ T 淋巴细胞水平的比较
与治疗前比较, * $P < 0.01$

2.4 近期疗效 细胞回输后,2 例患者 24 h 内出现发热,体温均低于 39 ℃,未予特殊处理,6 ~ 24 h 内恢复正常。患者均未出现恶心、呕吐、头痛等症状;未发现 3 级及以上不良反应。随访至 2013 年 5 月,13 例病情稳定,2 例病情进展。

3 讨论

HER-2 是具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜受体蛋白,是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族成员之一。HER-2 蛋白通过下游信号转导的级联反应,对细胞生长、存活及分化有着重要的调控作用^[10]。HER-2 基因过表达与乳腺癌密切相关,是显示乳腺癌预后的有力指标。靶向 HER-2 的单克隆抗体在乳腺癌治疗中显示出了显著疗效,利用 DC 负载 HER-2 多肽的免疫治疗不仅是前者的有力补充,亦显示出了协同作用^[11]。肿瘤患者免疫功能常处于抑制状态,外周淋巴细胞亚群可出现异常,如 CD3⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值减少等;晚期患者由于免疫衰减,淋巴细胞比例减少的同时会出现绝对数减少。机体免疫的 Th1/Th2 平衡在肿瘤发生发展过程中起着

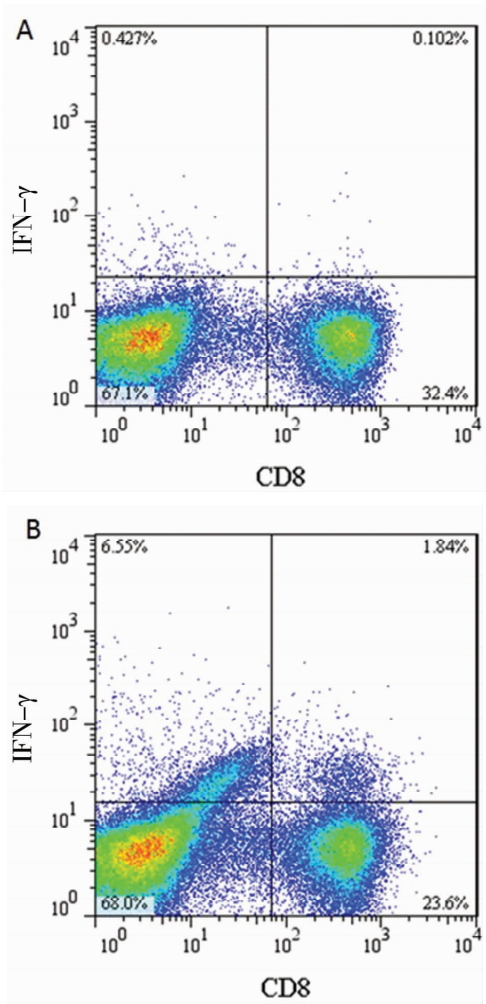


图 2 一例患者外周血 IFN- γ + CD8⁺ T 细胞
比例 (%) 的流式散点图
A:DC 治疗前;B:DC 治疗后

十分重要的作用,肿瘤患者免疫抑制导致抗肿瘤的 Th1 反应向促进肿瘤的 Th2 方向漂移(Th1/Th2 漂移),呈 Th2 类细胞因子强势表达^[12]。有研究发现以 DC 疫苗治疗后,外周 IFN- γ 水平显著升高,且在免疫应答患者中,其对数值与生存期呈正相关^[13]。

本研究中 HER-2 阳性乳腺癌患者经 DC 治疗后,外周血 CD3⁺ 比例、CD3⁺ CD4⁺ 比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前明显升高($P < 0.05$),且外周血中 Th1 类细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 水平也明显升高,IL-10/TNF- α 比值显著降低,提示 DC 免疫治疗能增强体内抗肿瘤细胞免疫,激发肿瘤患者的 Th1 型免疫反应。

有文献报道 DC 免疫治疗后激发特异性免疫反应的肿瘤患者预后更佳^[14-15],本研究中 15 例乳腺癌患者在 DC 治疗后外周血 IFN- γ + CD8⁺ T 淋巴细胞水平显著提高($P < 0.01$),其中 6 例患者治疗后 IFN- γ + CD8⁺ T 淋巴细胞升高 3 倍以上,表明激发了患者自身的特异性抗肿瘤免疫反应。受样本量及观察时间的影响,外周血 IFN- γ + CD8⁺ T 淋巴细胞水平与临床长期反应的相关性还需要更长期的研究与探讨。在治疗结束后的随访时间内,15 例患者取得了 13 例病情稳定,2 例病情进展的近期临床疗效,由于本组研究数量少,且随访时间有限,尚不能说明此 DC 疫苗治疗对生存的影响,有待进一步研究观察。

由上研究初步证实 DC 负载 HER-2 多肽治疗 HER-2 阳性乳腺癌的耐受性好,无明显不良反应,可诱导乳腺癌患者产生 Th1 型细胞免疫反应并增强特异性抗肿瘤免疫反应,该治疗有望成为 Her-2 阳性乳腺癌患者规范化治疗后一个有力的辅助治疗手段。

【参考文献】

- [1] 赵平,孔灵芝.中国肿瘤死亡报告:全国第三次死因回顾抽样调查[M].北京:人民卫生出版社,2010:132-143.
- [2] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [3] Tagliabue E,Balsari A,Campiglio M,et al. HER2 as a target for breast cancer therapy[J]. Expert Opin Biol Ther,2010,10(5):711-724.
- [4] Arteaga CL,Slivkowski MX,Osborne CK,et al. Treatment of HER2-positive breast cancer:current status and future perspectives[J]. Nat Rev Clin Oncol,2012,9(1):16-32.
- [5] Palucka K,Ueno H,Banchereau J. Recent developments in cancer vaccines[J]. J Immunol,2011,186(3):1325-1331.
- [6] Copier J,Bodman-Smith M,Dalgleish A. Current status and future applications of cellular therapies for cancer[J]. Immunotherapy,2011,3(4):507-516.
- [7] 孔练花,李军,韩亚萍,等.基因修饰的树突状细胞体外免疫功能的初步研究[J].东南国防医药,2011,13(6):481-484.
- [8] Eisenhauer EA,Therasse P,Bogaerts J,et al. New response evaluation criteria in solid tumours:revised RECIST guideline(version 1.1)[J]. Eur J Cancer,2009,45(2):228-247.
- [9] Trotti A,Colevas AD,Setser A,et al. CTCAE v3.0:development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment[J]. Semin Radiat Oncol,2003,13(3):176-181.
- [10] Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology[J]. Int J Dev Biol,2011,55(7-9):685-696.
- [11] Disis ML,Wallace DR,Gooley TA,et al. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol,2009,27(28):4685-4692.
- [12] Vergati M,Schlom J,Tsang KY. The consequence of immune suppressive cells in the use of therapeutic cancer vaccines and their importance in immune monitoring[J]. J Biomed Biotechnol,2011,2011:182413.
- [13] Wheeler CJ,Black KL,Liu G,et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients[J]. Cancer Res,2008,68(14):5955-5964.
- [14] Braumuller H,Wieder T,Brenner E,et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence[J]. Nature,2013,494(7437):361-365.
- [15] Kirkwood JM,Lee S,Moschos SJ,et al. Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine +/-granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma:Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696[J]. Clin Cancer Res,2009,15(4):1443-1451.

(收稿日期:2013-06-18;修回日期:2013-08-16)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)