

· 论 著 ·

热休克凋亡食管癌细胞抗原负载的树突状细胞联合放疗对食管癌的疗效

戴婷婷¹, 王万伟¹, 王成师², 郁汉旭², 刘艳艳², 严红焯², 何忠祥², 封昕², 濮娟²

1. 南京医科大学附属淮安第一医院放疗科, 江苏 淮安 223300;

2. 淮安市涟水县人民医院, 江苏 淮安 223400

摘要: **目的** 研究热休克凋亡自体食管癌肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞(dendritic cell, DC)对激发食管癌患者特异性免疫应答的影响及治疗的临床疗效。**方法** 选择2010年11月至2013年6月就诊的手术治疗后食管鳞癌患者40例,随机分为研究组(28例)与对照组(12例)。对照组行常规放疗,研究组采用放疗联合DC免疫治疗:(1)留取自体食管癌组织,经热休克处理(42℃,3h)后获得热休克凋亡食管癌抗原;(2)分离、培养外周血单个核细胞,其中贴壁细胞经过重组人粒细胞-单核细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、白细胞介素(IL)-4联合诱导为DC;(3)负载热休克抗原,培养1周后经患者腹股沟皮内注射,1周注射1次,共注射4次。在治疗后1周进行迟发型超敏反应(DTH)检测;在患者治疗前后进行血清中细胞因子和抗原特异性IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞检测,并进行免疫学疗效评价。治疗后跟踪随访2年,对远期疗效进行评价。**结果** 28例研究组食管癌患者对DC治疗耐受良好,治疗后患者血清中Th1型细胞因子(IL-2、IL-12、INF- γ)水平较治疗前和对照组治疗后均有显著提高(P 均 <0.01)。治疗后研究组IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞比例较对照组有显著提高($P<0.01$),其中10例患者IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞比例升高2倍以上。12例食管癌患者DTH试验呈阳性反应,其中9例IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞比例升高2倍以上。定期随访2年,两组均无脱落病例。研究组1年内死亡5例,存活82.14%;2年内共死亡9例,存活67.86%。对照组1年内死亡6例,存活50.00%;2年内共死亡8例,存活33.33%。研究组随访2年时生存比例大于对照组($P<0.05$)。**结论** 负载食管癌肿瘤细胞热休克凋亡抗原的DC能激发患者的特异性免疫应答、诱导Th1型细胞因子的分泌,联合放疗远期疗效良好,是一种安全的治疗方法。

关键词: 食管癌; 热休克; 抗原负载; 树突状细胞; 放疗; 细胞因子; IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞

中图分类号: R 735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1030-06

Efficacy of immunotherapy of DC loaded with heat-shocked apoptotic esophageal cancer cell antigen combined with radiotherapy for treatment of esophagus cancer

DAI Ting-ting*, WANG Wan-wei, WANG Cheng-shi, YU Han-xu,

LIU Yan-yan, YAN Hong-huan, HE Zhong-xiang, FENG Xin, PU Juan

* Department of Radiotherapy, Huai'an First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China

Corresponding author: PU Juan, E-mail: xp1214vip@163.com

Abstract: Objective To investigate the influence of autologous dendritic cells (DC) loaded with heat-shocked apoptotic esophageal cancer cell antigen on stimulating specific immune response of esophageal cancer patients and its clinical therapeutic effects. **Methods** Forty patients with esophageal squamous cell carcinoma after surgical treatment between June 2010 and November 2013 were selected and randomly divided into research group ($n=28$) and control group ($n=12$). The conventional radiotherapy was given in control group. In research group, the radiotherapy combined with DC immunotherapy were given: (1) Self esophageal cancer tissues were collected, and the esophageal cancer cell antigen was acquired after treatment of heat shock (42℃, 3 h). (2) The mononuclear cells were isolated from peripheral blood and cultured in which the adherent cells were induced to DC by recombinant human granulocyte monocyte colony stimulating factor (rhGM-CSF) combined with interleukin (IL)-4. (3) After being loaded with heat-shocked antigen and cultured for one week, the

DC were administered by intradermal injection in inguinal region (one time a week, a total of 4 times). Delayed type hypersensitivity (DTH) was detected one week after treatment. The cytokines in serum and antigen-specific interferon (IFN)- γ ⁺ CD8⁺ T cells were detected before and after the treatment, and the evaluation of immunological efficacy was performed. The patients were followed up for 2 years after treatment, and evaluation of long term efficacy was performed. **Results** All patients in research group had well-tolerance to DC therapy. In research group, The serum Th1 type cytokines (IL-2, IL-12, INF- γ) levels after treatment were all significantly higher than those before treatment and those after treatment in control group (all $P < 0.01$). After treatment, IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells level in research group increased significantly compared with control group ($P < 0.01$), and the proportion of IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells in 10 cases increased by more than three times. Positive DTH test was seen in 12 cases, in whom the proportion of IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells increased by more than three times in 9 cases. No case lost in both two groups during regular follow up for 2 years. In research group, 5 cases died within one year (1-year survival rate was 82.14%), and 9 cases died within 2 years (2-year survival rate was 67.86%). In control group, 6 cases died within one year (1-year survival rate was 50.00%), and 8 cases died within 2 years (2-year survival rate was 33.33%). The 2-year survival proportion in research group was significantly more than that in control group ($P < 0.05$).

Conclusion DC loaded with heat-shocked apoptotic esophageal tumor cell antigen can stimulate specific immune response of esophagus cancer patients and induce the secretion of Th1 type cytokines. DC immunotherapy combined with radiotherapy is a safe treatment method with good long-term curative effect.

Key words: Esophagus cancer; Heat shock; Antigen load; Dendritic cell; Radiotherapy; Cytokines; Interferon- γ ⁺ CD8⁺ T cell

食管癌是常见的消化道肿瘤,全世界每年新发病例近 50 万人,超过 40 万人死于食管癌^[1]。我国是世界上食管癌高发地区之一,每年平均病死约 20 万人^[2]。尽管目前食管癌可以采取手术、放疗、化疗和分子靶向治疗等多种综合手段,但其 5 年生存率仅为 20% ~ 25%^[3]。局部晚期食管癌是指 T 分期为 T2 ~ 4 或淋巴结转移阳性(N⁺),该类患者单纯手术治疗后局部复发率达 50%,因此多采取联合放疗和化疗的综合治疗模式以改善预后^[4]。目前局部晚期食管癌患者由于具体病情不同,可以采取多种治疗模式,但最佳治疗模式仍有待进一步探索。

基于抗原递呈细胞树突状细胞(dendritic cell, DC)的肿瘤免疫治疗被认为是一种有前途的肿瘤生物治疗手段,在食管癌的临床应用中显示了良好的安全性和一定的有效性^[5-7]。放射治疗是食管癌治疗的有效手段之一,国内外研究表明电离辐射下,DC 的表型、功能、生存状况会发生一定程度的改变,因而增强其免疫功能的发挥,一些研究表明放疗和 DC 免疫治疗联合使用有潜在的协同作用^[8-10]。

热休克可快速促进细胞高表达多种热休克蛋白(heat shock protein, HSP),HSP 是免疫佐剂,DC 表达 HSP 受体,可通过 HSP 受体介导机制提高抗原负载的效率,使 DC 激活更强的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应^[11-12];研究发现热休克处理使得肿瘤细胞高表达 HSP 和肿瘤相关抗原,用其负载 DC 能诱导更强的抗肿瘤免疫反应^[13]。本研究采用热休克诱导凋亡的自体食管癌细胞抗原负载自体 DC,对经过放

疗的食管癌术后患者进行免疫治疗,并设立单纯放疗对照组,对实施 DC 免疫治疗联合放疗在食管癌患者免疫功能中的影响和临床疗效进行初步观察。

1 资料与方法

1.1 临床资料 根据《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。2010 年 11 月至 2013 年 6 月经手术治疗后,并经病理证实为食管鳞癌的患者共计 40 例入选,Karnofsky 评分均在 60 分以上,患者造血功能及心、肝、脑、肾等重要器官功能正常,无自身免疫疾病,预计生存期超过 6 个月。排除标准:哺乳及妊娠期患者,存在感染等不能耐受放疗的急、慢性基础疾病,严重过敏体质或者对生物制品有过敏反应者。入选病例男 20 例,女性 20 例;年龄 44 ~ 74 岁,平均 56.7 岁;I 期 13 例,II 期 27 例。将 40 例患者随机分为研究组和对照组,研究组 28 例术后采用 DC 免疫治疗联合放疗方案,对照组 12 例术后常规放疗,两组放疗方案完全相同。两组患者在性别、年龄、肿瘤部位和分期等方面均衡可比,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

1.2 材料 无血清培养基购自 Hyclone 公司。重组人粒细胞-单核细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、白细胞介素(IL)-4、IL-1 β 、前列腺素(PG)E-2 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 购自 R&D 公司。淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司。流式抗体购自 BD 公司。细胞因子检测试剂盒购自北京四正柏生物科

表 1 两组食管癌患者的临床资料 (例)

组别	例数	性别		年龄 [岁, M (最小~最大)]	临床分期		病变部位			
		男	女		I 期	II 期	颈段	上胸段	中胸段	下胸段
研究组	28	15	13	59(44~72)	8	20	2	7	14	5
对照组	12	5	7	56(52~74)	5	7	1	3	6	2
P 值		0.414		0.525	0.571		0.632			

技公司。

1.3 方法

1.3.1 治疗方案 对照组单纯行放射治疗,放疗方案:总剂量 60 Gy,5 次/周,2 Gy/次,共照射 6 周。研究组患者于放疗前 1~3 d 采血,细胞培养 1 周,制备成热休克凋亡食管癌细胞抗原负载的 DC(具体见以下相关表述)进行 DC 免疫治疗,于腹股沟淋巴结富集区 10 cm 范围内皮内注射,DC 数量达到 $(4\sim6) \times 10^6$,每周注射 1 次,共 4 次。研究组放疗方法与对照组相同。

1.3.2 热休克凋亡肿瘤细胞的制备及质量检测^[11]

手术取食管癌组织,用无菌眼科剪将组织剪成约 1 mm^3 大小,在 200 目细胞筛上研磨,同时用培养基冲洗,单细胞悬液不连续密度梯度离心,分离肿瘤细胞。将细胞放置于细胞培养瓶中,经 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 热休克 3 h,再将细胞移置 $37\text{ }^\circ\text{C}$,加入 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 桦脂酸,5% CO_2 培养箱诱导 36~48 h 后收获细胞待检。收获的凋亡细胞加入无菌 PBS 洗涤 4 次,获得热休克凋亡食管癌细胞抗原。用膜联蛋白(Annexin)-V 和碘化丙啶(PI)双染色法检测细胞的凋亡率,按《药典》2010 版第三部(生物制品)规定的方法行无菌和内毒素检测,软琼脂克隆法检测体外成瘤率,裸鼠成瘤试验检测体内成瘤率。用 HSP60 和 HSP70 试剂盒检测不同条件下热休克蛋白的表达水平,进行比较,寻找最佳热休克条件。

1.3.3 抗原负载的 DC 的制备^[13] 采用血细胞分离机(COM. TEC)采集患者外周血单个核细胞,贴壁法获得单个核细胞。单个核细胞以含 100 ng/ml rhGM-CSF、 50 ng/ml 重组人工 IL-4(rhIL-4)的无血清培养基进行培养,培养后的第 3 天进行 1/3 换液(含细胞因子),第 5 天收获 DC,加入 1/3 DC 数量的热休克凋亡食管癌细胞抗原,共育 16 h 后,加入终浓度为 10 ng/ml 的 IL- 1β 、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 PGE-2、 20 ng/ml 的 TNF- α 继续培育 24 h,收获 DC,进行计数、内毒素、无菌、表型等检测,检测合格方可用于患者的回输注射。

1.3.4 微生物学及细胞因子水平检测 按《中华人民共和国药典》2010 版第三部(生物制品)规定的方法进行无菌、内毒素、革兰染色检测。分别于 DC 免疫前、免疫后第 7 天采集患者外周血,检测血清中 IL-2、IL-10、IL-12、干扰素(IFN)- γ 、TNF- α 的水平。对照

组患者在相同时点采样进行细胞因子水平检测。

1.3.5 抗原特异性 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞检测 同上采集患者外周血 5~10ml,密度梯度离心分离获取外周血淋巴细胞(PBL),按文献描述方法^[14]进行实验,采用胞内染色试剂盒(美国 BD 公司)检测。具体如下:按 PBL:DC = 10:1 的比例进行刺激 3~4 d,培养的最后 4~5 h,添加蛋白转运抑制剂 Brefeldin A(BFA)至终浓度 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$,终止刺激;收获洗涤细胞,进行 CD8-Percp 室温染色 20 min,4% 多聚甲醛固定 15 min 后,用破膜剂处理细胞 10 min,最后进行 IFN- γ -异硫氰酸荧光素(FITC)染色,流式细胞仪检测 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞。对照组患者在相同时点采样进行检测。

1.3.6 迟发型超敏反应(DTH)试验 DC 免疫后第 7 天进行 DTH 试验,用两支 1 ml 注射器,于两上肢前臂内侧行皮内注射,一侧为 DC,另一侧为生理盐水;做好相应标记。注射后 48~72 h 内观察注射部位有无红肿结节,直径 $>5\text{ mm}$ 者判断为 DTH 试验阳性。

1.3.7 安全性评价及随访跟踪分析 在每次 DC 回输后 30 min 及 24 h,对注射点及患者是否出现急性过敏反应进行监控并做及时处理。治疗过程中,根据美国国家癌症研究所毒性标准(NCI-CTC)观察患者是否出现不良反应。从治疗开始至患者死亡或未次随访时间,观察两组患者生存期、复发转移情况,以定期进行的影像学检查发现复发病灶为止。临床疗效根据实体瘤疗效评估标准(RECIST)进行评估。两组患者均随访 2 年,比较两组生存状况。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间治疗前后的比较采用配对 t 检验,组间比较采用成组 t 检验;热休克处理不同温度、不同时间 HSP 表达水平的比较采用多元重复测量方差分析;偏态资料以中位数(M)表示,组间比较采用秩和检验;对计数资料进行 χ^2 检验和校正 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 热休克凋亡肿瘤细胞抗原的制备结果及 HSP60 和 HSP70 表达水平 28 例食管癌患者自体肿瘤组织制备得到的瘤细胞数量为 $(15.32 \pm 2.17) \times 10^6/\text{g}$,细

胞活率为 $(87.75 \pm 8.34)\%$ 。热休克处理后细胞凋亡率为 $(94.68 \pm 6.83)\%$ ，最佳热休克条件为 42°C ，3 h。内毒素和无菌检测均合格，软琼脂克隆成瘤试验和裸鼠成瘤试验均为阴性。 42°C 热休克 3 h 的肿瘤细胞抗原表达的 HSP60 和 HSP70 水平分别为 $(3\ 610.71 \pm 208.02)\text{ng/mg}$ 和 $(2\ 810 \pm 100.8)\text{ng/mg}$ ，较热休克 1 h [$(1\ 878.21 \pm 153.96)\text{ng/mg}$ 和 $(627.61 \pm 103.73)\text{ng/mg}$] 明显上升 (P 均 <0.01)，也较 37°C 热休克 3 h [$(735.32 \pm 101.37)\text{ng/mg}$ 和 $(358.64 \pm 63.57)\text{ng/mg}$] 显著上升 (P 均 <0.01)。如图 1。

2.2 DC 表型分析结果 成熟 DC 中 $\text{CD11c}^+\text{HLA-DR}^+$ 细胞为 $(84.61 \pm 3.64)\%$ ， $\text{CD11c}^+\text{CD80}^+$ 细胞为 $(82.36 \pm 5.68)\%$ ， $\text{CD11c}^+\text{CD83}^+$ 细胞为 $(58.46 \pm 5.56)\%$ ， $\text{CD11c}^+\text{CD86}^+$ 细胞为 $(92.34 \pm 6.88)\%$ 。如图 2。内毒素、革兰染色和无菌检测均合格。

2.3 DC 免疫治疗前后患者外周血中细胞因子水平的变化 28 例研究组患者 4 次 DC 免疫治疗后血清 IL-2、IL-12 和 IFN- γ 水平较治疗前和对照组治疗后均有显著提高 (P 均 <0.01)，而对照组治疗后较治疗前无明显变化 (P 均 >0.05)。见表 2。

2.4 DC 免疫治疗后 T 细胞免疫应答 4 次 DC 治疗后，研究组 28 例患者中 10 例 IFN- $\gamma^+\text{CD8}^+$ T 细胞比例升高 2 倍以上，12 例患者 DTH 试验呈阳性反应；DTH 阳性同时 IFN- $\gamma^+\text{CD8}^+$ T 细胞升高 2 倍以上 9 例。对照组 DC 治疗后 DTH 无 1 例阳性，IFN- $\gamma^+\text{CD8}^+$ T 细胞比例无变化 ($P > 0.05$)；研究组 DC 治疗后 IFN- $\gamma^+\text{CD8}^+$ T 细胞比例较治疗前及对照组 DC 治疗后均显著提高 (P 均 <0.01)。见表 3。

2.5 DC 免疫治疗的临床安全性 热休克诱导凋亡的肿瘤细胞抗原负载 DC 回输后 30 min 及整个治疗过程所有患者均未出现恶心、寒战、发热、红肿、乏力等不良症状。对 DCs 回输前后的肝和肾功能检测结果显示，生化指标没有明显的变化，因而对人的肝肾功能无明显影响。回输前后的血常规检测结果显示，各血液成分在正常范围内。从上述结果分析 DC 治疗是安全的，无明显毒副作用。

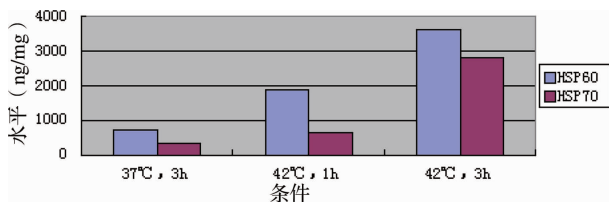


图 1 食管癌肿瘤细胞抗原不同条件下 HSP60、HSP70 的表达水平

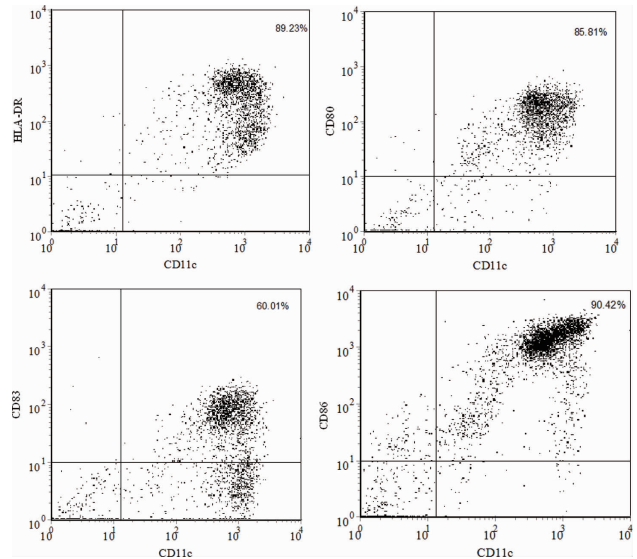


图 2 负载热休克凋亡抗原的 DC 细胞表型的检测流式图

表 2 两组食管癌患者治疗前后外周血中细胞因子水平情况 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-2	IL-12	INF- γ
研究组				
治疗前	28	34.14 \pm 7.30	29.18 \pm 7.99	23.68 \pm 8.49
治疗后	28	65.57 \pm 10.37*	49.93 \pm 12.36*	74.46 \pm 15.22*
P 值		<0.01	<0.01	<0.01
对照组				
治疗前	12	29.00 \pm 6.04	35.92 \pm 7.28	24.00 \pm 6.07
治疗后	12	25.58 \pm 5.62	33.17 \pm 8.49	29.08 \pm 7.89
P 值		>0.05	>0.05	>0.05

注：与对照组治疗后比较，* $P < 0.01$ 。

表 3 两组食管癌患者治疗前后特异性 T 细胞免疫应答情况

组别	例数	IFN- $\gamma^+\text{CD8}^+$ T (% , $\bar{x} \pm s$)		DTH 阳性 [(例)%]
		治疗前	治疗后	
研究组	28	0.22 \pm 0.13	1.94 \pm 1.72*	12(42.86)
对照组	12	0.28 \pm 0.14	0.30 \pm 0.12	0
P 值		>0.05	<0.01	<0.05

注：与本组治疗前比较，* $P < 0.01$ 。

2.6 随访结果 定期随访 2 年，两组均无脱落病例。研究组 1 年内死亡 5 例，存活 82.14%；2 年内共死亡 9 例，存活 67.86%。对照组 1 年内死亡 6 例，存活 50.00%；2 年内共死亡 8 例，存活 33.33%。研究组随访 2 年时生存比例大于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

热休克凋亡肿瘤细胞抗原负载 DC 细胞，有助于 DC 成熟度的提高，并能高表达共刺激分子^[15-16]。本研究的结果显示，热休克诱导凋亡的食管癌细胞高表达 HSP60 和 HSP70，体内外成瘤试验均为阴性，无致癌性，表明其是安全的。采用其负载的 DC，成熟表型 $\text{CD11c}^+\text{CD83}^+$ 为 $(58.46 \pm 5.56)\%$ ，同时高表达共刺激分子 CD80 和 CD86。

采用 DC 为基础的免疫治疗可有效诱导抗肿瘤免疫反应、增加肿瘤细胞对放疗的敏感性,是一种新的策略。免疫治疗发挥作用主要通过 3 个阶段:(1)免疫细胞的激活与分化,通常在治疗后的数天到数周;(2)临床可观察到的反应(如肿瘤大小的变化等),通常是治疗后的数周到数月;(3)转化为潜在生存获益,通常是数月甚至数年^[17],因此,DC 免疫治疗的早期疗效评价应能反映生物活性的变化情况,采用与 DC 免疫治疗相适应的评价体系很重要^[18]。免疫细胞的激活是肿瘤疫苗治疗后的第一个生物学事件,标志着肿瘤免疫应答是否产生,因此在临床上检测一些能反映免疫细胞激活状态的免疫指标对肿瘤疫苗的临床应用非常有意义。本研究参照 FDA 2009 年发布的《癌症治疗性疫苗及相关生物制品临床试验基本规范》^[19],分别从细胞因子(IL-2、IL-12 和 IFN- γ)、IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞、DTH 的检测来观察 DC 免疫治疗后患者的免疫状态。

IL-2、IL-12 和 IFN- γ 在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用,均为 Th1 细胞直接分泌。Wheeler 等^[20] 在世界上首次报道了 DC 免疫治疗不仅能激发 Th1 型抗肿瘤免疫反应,而且在免疫应答的患者中,激发的淋巴细胞分泌的 IFN- γ 的量与患者的疾病进展时间和总生存期呈正相关,本研究发现,经热休克诱导凋亡的肿瘤细胞负载的 DC 免疫治疗后,不仅 IFN- γ 的水平,其他 Th1 类细胞因子 IL-2、IL-12 的水平也明显升高,提示 DC 免疫治疗能诱导增强体内抗肿瘤细胞免疫,可激发肿瘤患者的 Th1 型免疫反应,而仅进行放疗治疗的患者未观察到细胞因子水平的变化。

本研究对 28 例患者进行了特异性 T 细胞检测,12 例患者 DTH 试验结果阳性,10 例患者 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞升高 2 倍以上,其中有 9 例患者 DTH 阳性同时伴有 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞升高 2 倍以上。有报道表明 DC 免疫治疗后 DTH 阳性的恶性黑色素瘤患者有更长的生存期^[21],对本研究而言,受样本量及观察时间的影响,DTH 阳性和 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 升高的关系及其与临床长期反应的相关性还有待进一步研究。

一些研究表明放疗和 DC 免疫治疗联合使用有潜在的协同作用^[8-10]。本研究结果表明研究组放疗联合 DC 免疫治疗 1 年时存活比例 82.14%;2 年时存活比例 67.86%。对照组单纯放疗 1 年时存活比例 50.00%;2 年时存活比例 33.33%。研究组随访 2 年时的生存比例大于对照组。因此本实验结果表明负载热休克凋亡自体肿瘤细胞抗原的 DC 对食管癌患者的特异性免疫治疗在一定程度上可防止疾病的进展,但是受观察时间和样本量的影响,DC 对食管

癌患者病情缓解和生存期的影响还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 全国肿瘤登记中心. 2014 年中国肿瘤登记年报 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2014.
- [3] Villafior VM, Allaix ME, Minsky B, et al. Multidisciplinary approach for patients with esophageal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(46): 6737-6746.
- [4] Bollschweiler E, Baldus SE, Schröder W, et al. Staging of esophageal carcinoma: length of tumor and number of involved regional lymph nodes. Are these independent prognostic factors? [J]. *J Surg Oncol*, 2006, 94(5): 355-363.
- [5] Iwahashi M, Katsuda M, Nakamori M, et al. Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8⁺ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2510-2517.
- [6] Deng YJ, Zhang LJ, Su XD, et al. Dendritic cell-tumor cell fusion vaccine prevents growth of subcutaneous transplanted esophageal carcinomas [J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(10): 1067-1071.
- [7] Fujiwara S, Wada H, Miyata H, et al. Clinical trial of the intratumoral administration of labeled DC combined with systemic chemotherapy for esophageal cancer [J]. *J Immunother*, 2012, 35(6): 513-521.
- [8] Milano F, Rygiel AM, Buttar N, et al. An ex vivo readout for evaluation of dendritic cell-induced autologous cytotoxic T lymphocyte responses against esophageal cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(12): 1967-1977.
- [9] Roses RE, Datta J, Czerniecki BJ. Radiation as immunomodulator: implications for dendritic cell-based immunotherapy [J]. *Radiat Res*, 2014, 182(2): 211-218.
- [10] Gupta A, Probst HC, Vuong V, et al. Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8⁺ T cells via dendritic cell activation [J]. *J Immunol*, 2012, 189(2): 558-566.
- [11] 王勇, 张科, 童继春, 等. 树突状细胞负载肺癌细胞抗原的方法研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(11): 1113-1115.
- [12] Maeda Y, Yoshimura K, Matsui H, et al. Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a phase 1 dose escalation clinical trial [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(8): 1047-1056.
- [13] Shi H, Cao T, Connolly JE, et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming [J]. *J Immunol*, 2006, 176(4): 2134-2141.
- [14] 朱玉兰, 钱科卿, 秦建伟, 等. 乳腺癌细胞抗原负载的自体树突状细胞体内诱导特异性 T 细胞应答 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(6): 708-710.
- [15] Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6128-6133.

关节炎的发病及预后关系密切,特别是 MMP-3、MMP-9 直接作用于关节软骨的细胞外基质,通过对基质中的蛋白多糖和胶原进行降解,破坏关节软骨结构,且能够激活间质胶原酶,从而造成软骨弹性丧失,导致关节肿痛,进一步致使软骨损伤^[13-15]。本研究结果表明,阳性对照组、辛伐他汀组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平较模型组显著下降,且辛伐他汀组血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平低于阳性对照组,提示辛伐他汀可明显降低血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 含量,且效果优于使用扶他林的阳性对照组。

综上所述,辛伐他汀能改善膝骨性关节炎大鼠的症状,可能通过降低大鼠血清 IL-1 β 、MMP-3、MMP-9 水平,调节机体细胞因子和保护软骨基质而发挥作用。

参考文献

[1] 郑占乐,孙英彩,张晓然,等. 膝关节炎性关节发病机制的临床影像学研究[J]. 河北医科大学学报,2014,35(5):599-600.

[2] 田少奇,王斌,孙康,等. 青岛地区中老年人膝骨关节炎流行病学研究[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2015,9(6):762-766.

[3] 刘洪柏,张鸣生,区丽明,等. 体外冲击波对大鼠膝骨关节炎白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2014,29(3):208-211,217.

[4] 徐育冬,朱强,李彦琦,等. 辛伐他汀对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响[J]. 免疫学杂志,2011,27(5):455-458.

[5] 付志媛,欧阳厚涂. 骨炎康颗粒对膝骨性关节炎大鼠血清 II 型胶原、TGF- β 1、IL-1 β 作用的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(12):1275-1277,1310.

[6] 沈明球,刘俊昌,王新军,等. 新疆北疆牧区维、哈、汉族膝骨性关节炎致病因素的流行病学调查[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4614-4618.

[7] 宰庆书,蒋长伟,岳耀升,等. 鲁西南邹城市膝骨性关节炎的流行病学调查及早期阶梯性治疗[J]. 中国组织工程研究,2015,19(29):4609-4613.

[8] 陈伟玲,梁柳琴,邱茜,等. 辛伐他汀对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞分泌趋化因子的影响及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(10):1972-1976.

[9] 吴银松. 辛伐他汀对骨关节炎软骨保护作用的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2007.

[10] 李强,周国庆,邓紫婷,等. 复元胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 β 、OPG 和 OPGL mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(14):3930-3933.

[11] 潘建科,罗斌,郭达,等. 龙螯胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(5):1675-1679.

[12] 姚丽,赵婧,周强,等. 祛痰化痰利湿方对大鼠膝骨关节炎滑膜组织和血清 IL-1 β 、MMP-1 及 COMP、CTX-II 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2015,23(11):5-8,14.

[13] 莫汉有,王丽芳,周润华,等. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响[J]. 重庆医学,2011,40(7):628-630.

[14] 戚晴雪,王玉峰,吴忌,等. 低频超声促透通络止痛中药对不同程度膝骨关节炎大鼠模型 CTX-II、COMP 及 MMP-3 的影响[J]. 世界中医药,2015,10(4):564-569.

[15] 麻圣达,卢雄,罗利飞. 玻璃酸钠对膝骨性关节炎患者关节液中基质金属蛋白酶-3、9 水平的影响及疗效观察[J]. 中国现代医生,2014,52(1):42-44.

收稿日期:2016-04-20 修回日期:2016-05-24 编辑:周永彬

(上接第 1034 页)

[16] Um SJ,Choi YJ,Shin HJ,et al. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2010,70(2):188-194.

[17] Hoos A,EggermontAM,Janetzki S,et al. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials [J]. J Natl Cancer Inst,2010,102(18):1388-1397.

[18] Nishino M,Giobbie-Hurder A,Gargano M,et al. Developing a common language for tumor response to immunotherapy:immune-related response criteria using unidimensional measurements[J]. Clin Cancer Res,2013,19(14):3936-3943.

[19] FDA. Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines:Draft

Guidance[EB/OL]. (2012-09-20). <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/>.

[20] 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.

[21] López MN,Pereda C,Segal G,et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells [J]. J Clin Oncol,2009,27(6):945-952.

收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-05-16 编辑:王娜娜