

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.007

活化自体淋巴细胞过继性免疫治疗在原发性肝细胞癌中的疗效观察

杨岩丽¹, 廖丽¹, 张婧¹, 孙鹏¹, 高岛健一², 张凤春², 杨玉惠², 张斌¹, 胡亮钉¹ (1. 中国人民解放军总医院第五医学中心 造血干细胞移植科, 北京 100071; 2. 北京龙宝科技集团 北京康达行健科技发展有限公司, 北京 100176)

[摘要] **目的:** 评价活化自体淋巴细胞过继性免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)是否有助于改善原发性肝细胞癌的临床疗效。**方法:** 选取2016年8月至2018年12月在中国人民解放军总医院第五医学中心确诊的64例原发性肝细胞癌患者,通过分层随机法分为免疫治疗组($n=29$)和对照组($n=35$)。免疫治疗组患者取60 ml外周血分离制备单个核细胞并在含OKT-3和IL-2的培养基中活化培养,回输前进行质控检测。免疫治疗组中的I~III期患者($n=14$)于一线治疗后接受自体淋巴细胞输注(3个月内输注6次),IV期患者($n=15$)仅接受自体淋巴细胞输注;对照组患者接受肝细胞癌相关的其他治疗。疗效评估的主要终点是2年无复发生存(relapse-free survival, RFS)率,次要终点为无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)。**结果:** 入组患者中位随访时间为2.8年(0.2~4.2年)。免疫治疗组29名患者共接受了167次(计划174次,完成率96%)预定淋巴细胞输注(平均每人每次回输 9.30×10^9 个细胞,其中CD3⁺HLA-DR细胞约占63%),治疗期间未观察到3级或4级不良反应发生。与对照组相比,免疫治疗组患者2年RFS率显著升高(62.1% vs 22.9%, $OR=0.181$, 95%CI: 0.06~0.54, $P=0.002$),中位PFS(28 vs 8个月, $P=0.004$)和中位OS(38 vs 34个月, $P=0.915$)均显著延长。在I~III期患者中,免疫治疗组($n=14$)2年RFS率较对照组($n=18$)显著升高(92.9% vs 33.3%, $OR=0.38$, 95%CI: 0.004~0.368, $P=0.005$),中位PFS明显延长(38 vs 14.5个月, $P=0.005$),而两组OS间无显著差异;IV期患者两组间PFS($P=0.077$)及OS($P=0.994$)均未见显著差异。**结论:** 活化自体淋巴细胞AIT为安全可行的肝细胞癌辅助性治疗方法,可提高I~III期肝细胞癌一线治疗后RFS率、延长患者RFS时间,而对进展期肝细胞癌患者的PFS和OS无明显影响。

[关键词] 原发性肝细胞癌;活化自体淋巴细胞;过继性免疫治疗;无进展生存期;总生存期

[中图分类号] R735.7;R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)11-1098-09

Observation on the effect of adoptive immunotherapy with activated autologous lymphocytes in the treatment of primary hepatocellular carcinoma

YANG Yanli¹, LIAO Li¹, ZHANG Jing¹, SUN Peng¹, TAKASHIMA Kenichi², ZHANG Fengchun², YANG Yuhui², ZHANG Bin¹, HU Liangding¹ (1. Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071, China; 2. Beijing Kand's Science and Technology Development Co., Ltd., Beijing Longbao Technology Development Co., Ltd., Beijing 100176, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate whether adoptive immunotherapy (AIT) with activated autologous lymphocytes helps to improve the clinical efficacy of primary hepatocellular carcinoma. **Methods:** Sixty-four patients with primary hepatocellular carcinoma diagnosed at the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital from August 2016 to December 2018 were enrolled and divided into immunotherapy group ($n=29$) and control group ($n=35$) by the stratified randomized sampling method. 60 ml of peripheral blood was drawn from each patient in the immunotherapy group to prepare mononuclear cells, which were then activated and cultured in a medium containing OKT-3 and IL-2. A quality control test was done before blood re-transfusion. In the immunotherapy group, patients in stage I -III ($n=14$) received autologous lymphocyte infusion (6 infusions within 3 months) after first-line treatment, while patients in stage IV ($n=15$) only received autologous lymphocyte infusion therapy. Patients in the control group received other

[基金项目] 军队后勤科研重大项目资助(No. AWS17J010)。Project supported by the Major Project of Military Logistics Research (No. AWS17J010)

[作者简介] 杨岩丽(1976—),女,硕士,主治医师,主要从事肿瘤生物治疗的临床研究,E-mail:yang307307@163.com

[通信作者] 胡亮钉(HU Liangding, corresponding author),硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事血液肿瘤的研究,E-mail:huliangding@sohu.com;张斌(ZHANG Bin, co-corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事造血干细胞移植、细胞治疗、干细胞研究与转化应用相关研究,E-mail:zb307ctc@163.com

hepatocellular carcinoma-related treatments. The primary endpoint of the efficacy evaluation was the 2-year relapse-free survival (RFS), and the secondary endpoints were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Results:** The median follow-up time of the enrolled patients was 2.8 years (0.2-4.2 years). 29 patients in the immunotherapy group received a total of 167 scheduled lymphocyte infusions (with an average of 9.30×10^9 cells per patient, of which CD3⁺HLA-DR cells accounted for about 63%; 174 infusions were planned, with a completion rate of 96%). During the treatment period, no grade 3-4 adverse reactions were observed. Compared with the control group, patients in the immunotherapy group had a significantly increased 2-year RFS rate (62.1% vs 22.9%, $OR=0.181$, 95% CI : 0.06-0.54, $P=0.002$), and the median PFS (28 vs 8 months, $P=0.004$) and median OS (38 vs 34 months, $P=0.915$) were significantly prolonged. Among the patients at stage I-III, the PFS rate in the immunotherapy group was significantly higher than that in the control group (92.9% vs 33.3%, $OR=0.38$, 95% CI : 0.004-0.368, $P=0.005$), and the median PFS was significantly prolonged (38 vs 14.5 months, $P=0.005$), but there was no significant difference in OS between the two groups. In stage IV patients, there was no statistical difference in PFS ($P=0.077$) and OS ($P=0.994$) between the two groups. **Conclusion:** AIT with activated autologous lymphocytes is a safe and feasible adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma, which can improve RFS rate after first-line treatment of stage I-III hepatocellular carcinoma and prolong the recurrence-free survival time of patients. It has no significant effect on PFS and OS in patients with advanced hepatocellular carcinoma.

[Key words] primary hepatocellular carcinoma; activated autogenous lymphocyte; adoptive immunotherapy (AIT); relapse-free survival (RFS); overall survival (OS)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(11): 1098-1106. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.007]

原发性肝癌为最常见的恶性肿瘤之一,在中国,肝癌发病率居恶性肿瘤第4位,病死率居第2位^[1],尤以乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染相关肝癌为主,主要病理分型包括肝细胞癌、胆管细胞癌和混合型肝癌,其中80%~90%的病理类型为肝细胞癌^[2]。随着近年来影像检查技术的普及和诊断准确度的提高,肝癌的早期诊断率有所升高,但其术后复发率仍高达60%~80%,且多发生在术后2年内^[3-4];同时,晚期肝癌的预后仍然没有得到明显的改善,其中位生存期仅1~2年^[5],肝癌的治疗面临着巨大的挑战。在过去的几十年里,癌症免疫疗法极大地推动了肿瘤治疗的发展^[6]。肝与大多数器官不同,其接触肠道内暴露的抗原较多,加上肝疾病导致的慢性炎症刺激,使肝内形成了免疫耐受的微环境。基因表达谱表明,约25%的肝癌样本表达了炎症反应的标志物,这表明肝癌可能对免疫治疗有更好的敏感性^[7]。因此,免疫相关疗法可能成为一种理想的肝癌治疗方法,且已取得一定的成果^[8-15]。本研究采集肝细胞癌患者外周血(不需要体外循环血细胞分离技术),将外周血T细胞通过2周的体外扩增培养技术进行扩增,经随机对照试验对活化自体淋巴细胞过继性免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)的安全性以及是否可以降低肝癌复发率、延长复发时间和提高总生存(overall survival, OS)率进行评估。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2016年8月至2018年12月期间在中国人民解放军总医院第五医学中心治疗的经组织病理学确诊的原发性肝细胞癌患者,根据美国肿瘤联合委

员会(AJCC)制定的癌症分期系统(第8版)对肿瘤进行TNM分期和解剖分期(I~IV期);根据Child-Pugh评级标准将肝功能评为A或B级。纳入标准:有充足的骨髓和肾脏储备(白细胞计数 $>3 \times 10^9$ 个/L、血小板 $>50 \times 10^9$ 个/L和肌酐 $<88.4 \mu\text{mol/L}$)且年龄 ≥ 18 岁。排除标准:肝功能Child-Pugh评级C级,既往/同时患其他恶性疾病或任何器官发生功能衰竭。通过分层随机法将患者分入免疫治疗组或对照组。本研究经医院伦理委员会审查批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

i-Mediam培养基(主要成分:葡萄糖类、氨基酸、维生素、无机盐、蛋白质、水、药品级人血白蛋白、IL-2)、OKT-3(抗人CD3单克隆抗体)包被瓶和冻存液均购自日本GC LYMPHOTEC公司,抗CD3单克隆抗体购自日本扬森协和工业株式会社,人血白蛋白购自瑞士杰特贝林生物制品有限公司,内毒素检测试剂盒购自福州新北生化工业有限公司,淋巴细胞分离液购自天津美德太平洋生物科技股份有限公司,倒置显微镜购自意大利OPTIKA公司,干热孵育器购自日本TAALIEC公司,无菌接合器和热合封管机购自日本TERUMO公司,无油隔膜式废液抽吸泵购自美国Sci-Tool公司,程序降温盒购自日本NIHON-FREEZER公司。

1.3 自体淋巴细胞的活化培养

所有治疗组入组患者第0天抽取60 ml外周血,分离制备单个核细胞,按 6×10^7 个/ml以上的细胞密度接种于已包被OKT-3的培养瓶,加入750 U/ml的重组IL-2和固定抗CD3单克隆抗体(5 $\mu\text{g/ml}$)体外共培养,第4天补充培养基,第5天收集细胞后冻存6支

(3×10^7 个/支), 第6天将冻存细胞转至液氮, 第7天复苏1支(3×10^7 支)细胞, 用含 750 U/ml IL-2 的培养基培养, 第9天转至 225 cm² 培养瓶并补充培养基, 第11天转入 OKT-3 包被瓶, 第12天转入细胞培养袋, 培养基中含 175 U/ml 的 IL-2, 保持细胞密度在 1×10^6 个/ml 以上, 第21天收获第一批细胞。其余5支细胞作为第2至第6次培养的来源。

1.4 活化自体淋巴细胞回输前的质控检测

细胞输注前于显微镜下观察淋巴细胞的形态, 同时取样测验内毒素、支原体、衣原体、细菌培养、真菌培养2次, 流式细胞仪检测淋巴细胞表型。

1.5 治疗方案

免疫治疗组患者接受活化自体淋巴细胞输注(图1), 对照组患者接受其他治疗。对于 I~III 期患者, 免疫治疗组于一线治疗后接受自体淋巴细胞输注(距一线治疗后中位间隔时间3个月, 范围1~7个月), 对照组一线治疗后无辅助治疗; 对于IV期患者, 免疫治疗组仅接受自体淋巴细胞输注, 对照组接受其他肝癌相关治疗[二次手术、经导管动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)和TKI药物治疗等]。

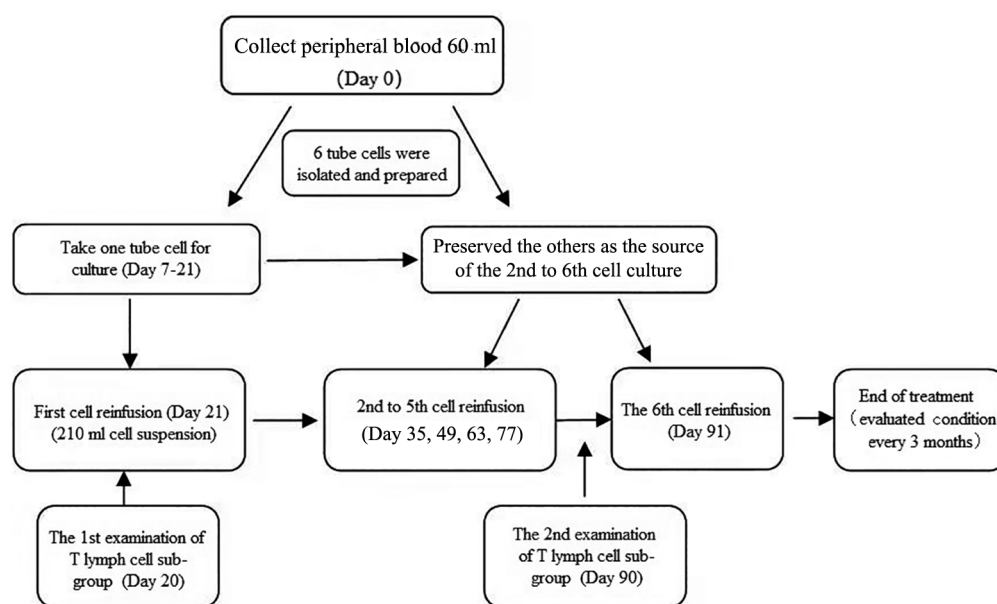


图1 活化自体淋巴细胞的培养及AIT流程图

Fig.1 A schematic diagram of activated autologous lymphocyte culture and AIT

治疗组入组患者于第21天接受首次静脉注射自体淋巴细胞, 之后每2周回输1次, 共计6次, 平均每次回输细胞(9.30 ± 2.59) $\times 10^9$ 个。记录患者治疗过程中发生的所有不良反应, 并按照WHO抗癌药物常见毒副反应分级标准进行分级。用患者是否在指定日期的2周内按计划方案输注培养的淋巴细胞来判断治疗的依从性。

试验评估的主要终点为2年无复发生存(relapse-free survival, RFS)率, 次要终点为无进展生存期(progression-free survival, PFS)和OS。每3个月对所有患者进行肝超声检查、肝增强磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检查和甲胎蛋白测定, 每6个月进行胸部计算机断层扫描术(computer tomography, CT)检查。若怀疑复发则行肝血管造影、碘油造影、胸部CT检查或利用发射型计算机断层成像(emission computerized tomography, ECT)技术进行骨扫描显像。

对于肿瘤复发的患者, 允许患者进行二次切除或其他治疗(TACE、TKI药物和PD-1/PD-L1抑制剂治疗等)。

数据分析中, 将入组患者进一步分为 I~III 期(病灶均局限于肝内)和IV期(有肝外转移)两组。I~III 期均为一线治疗后观察期患者, 其中免疫治疗组($n=14$)于一线治疗后接受活化自体淋巴细胞输注; 对照组($n=18$)无辅助治疗。IV期患者均为进展期肝癌, 免疫治疗组($n=15$)仅接受活化自体淋巴细胞输注, 对照组($n=17$)接受其他肝癌相关治疗(包括二次手术、TACE、TKI药物、PD-1/PDL-1抑制剂等)。终止治疗标准: 出现3级或4级毒性反应; 评估为病情进展; 患者死亡。

1.6 疗效评价

记录首次复发和各种原因造成的死亡。将复发定义为出现具有典型肝癌影像学特征的新病灶, 至

少有两种影像学表现。首次发现复发由两位非研究组的放射科医师独立记录。计算2年无复发生存率及患者总体生存情况。所有时间的计算都以入组日期作为基线。所有患者随访至少2年(除非2年内患者死亡)。

1.7 流式细胞术检测AIT对患者外周血淋巴细胞亚群水平的影响

免疫治疗组所有患者于首次输注前、第6次输注前分别采集2 ml静脉血,用流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群——辅助性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)、CD3⁺CD4⁻CD8⁺、CD3⁺CD19⁻、CD3⁻CD19⁺、CD3⁻CD16⁺CD56⁺、CD3⁺CD16⁺CD56⁺、CD3⁺HLA-DR⁻、CD3⁺HLA-DR⁺、细胞毒性T细胞(CD3⁺CD28⁺CD8⁺)和CD3⁺CD4⁺CD25⁺细胞——水平的动态变化。

1.8 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件分析,采用卡方检验比较两组患者复发及生存数据,采用对数秩检验对复发进行单变量分析并绘制Kaplan-Meier曲线。通过Cox模型评估IV期免疫治疗组复发类型与治疗效果与之间的相关性。采用配对 t 检验对患者输注前后外周血淋巴细胞亚群动态变化进行分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效分析

免疫治疗组中,有1例患者仅接受1次淋巴细胞输注后因拒绝治疗退出研究,未纳入统计分析,最终入组64例,免疫治疗组29例、对照组35例,两组的基线特征相似(表1)。

表1 肝细胞癌患者的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma

Characteristic	Stage I -III (n=32)		Stage IV (n=32)		Total (n=64)	
	Immunotherapy (n=14)	Control (n=18)	Immunotherapy (n=15)	Control (n=17)	Immunotherapy (n=29)	Control (n=35)
Age/a						
Mean	54	52	60	53	57	52
<60	11 (78.6%)	17 (94.4%)	6 (40.0%)	14 (82.4%)	17 (58.6%)	31 (88.6%)
≥60	3 (21.4%)	1 (5.6%)	9 (60.0%)	3 (17.6%)	12 (41.4%)	4 (58.6%)
Gender						
Male	10 (71.4%)	15 (83.3%)	12 (80.0%)	16 (94.1%)	22 (75.9%)	31 (88.6%)
Female	4 (28.6%)	3 (16.7%)	3 (20.0%)	1 (5.9%)	7 (24.1%)	4 (11.4%)
Child-Pugh class						
A	13 (92.9%)	16 (88.9%)	11 (73.3%)	12 (70.6%)	24 (82.8%)	28 (80%)
B	1 (7.1%)	2 (11.1%)	4 (26.7%)	5 (29.4%)	5 (17.2%)	7 (20%)
Tumor size (d/mm)						
<50	12 (85.7%)	14 (77.8%)	3 (20.0%)	5 (29.4%)	15 (51.7%)	19 (54.3%)
≥50	2 (14.3%)	4 (22.2%)	12 (80.0%)	12 (70.6%)	14 (48.3%)	16 (45.7%)
Tumor number						
Single	12 (85.7%)	14 (77.8%)	2 (12.5%)	3 (17.6%)	14 (48.3%)	12 (34.4%)
Multiple	2 (14.3%)	4 (22.2%)	13 (81.3%)	14 (82.4%)	15 (51.7%)	23 (65.7%)
TNM stage						
I	5 (35.7%)	10 (55.6%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (35.7%)	10 (28.6%)
II	7 (50.0%)	7 (38.9%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (50.0%)	7 (20%)
III	2 (14.3%)	1 (5.6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (14.3%)	1 (2.9%)
IV	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)	17 (100%)	15 (51.7%)	17 (48.6%)
Previous treatment						
Hepatectomy	11 (75%)	13 (72.2%)	8 (53.3%)	7 (41.2%)	19 (65.5%)	20 (57.1%)
TACE	2 (14.3%)	4 (22.2%)	4 (26.7%)	8 (47.1%)	6 (20.7%)	12 (34.3%)
TKI	1 (7.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5.9%)	1 (3.4%)	1 (2.9%)
Others	0 (0%)	1 (5.6%)	3 (20.0%)	1 (5.9%)	3 (10.3%)	2 (5.7%)

2.1.1 成功培养活化自体淋巴细胞并回输 免疫治疗组中29例患者均成功培养了活化自体淋巴细胞。经过2周培养,细胞平均数量从 1.30×10^7 个增殖至 9.30×10^9 个,增长至原来的715倍(范围:220.60~1936.77倍),且多数细胞均表达T细胞标志物(95%为 $CD3^+$,63%为 $CD3^+HLA-DR$,35%为 $CD4^+$,26%为 $CD8^+$),存活率达99%,未受细菌、真菌、内毒素、支原体及衣原体污染。29例患者共接受了167次预定淋巴细胞输注(计划共174次,完成率96.0%),平均每人每次回输细胞 9.30×10^9 个,其中24例接受了全部6次淋巴细胞输注,4例因病情进展接受了3或4次输注而退出治疗,1例接受了5次输注后因其他疾病(慢性心功能不全急性发作)退出治疗。

2.1.2 疗效评价 无患者失访,中位随访时间2.8年(范围0.2~4.2年)。免疫治疗组患者2年内发生病情进展的有11例(37.9%),显著低于对照组的27例(77.1%)。免疫治疗组患者2年RFS率较对照组显著升高(62.1% vs 22.9%, $OR=0.181$, $95\%CI: 0.06 \sim 0.54$, $P=0.002$)。RFS Kaplan-Meier生存分析曲线见图2。免疫治疗组患者PFS较对照组明显延长(中位PFS 28 vs 8个月, $P=0.004$)。免疫治疗组死亡6例(20.7%)、对照组死亡3例(8.6%),死亡原因均为肿瘤复发。两组OS率($OR=2.78$, $95\%CI: 0.63 \sim 12.30$, $P=0.177$)和中位OS(38 vs 34个月, $P=0.915$)均无显著差异。

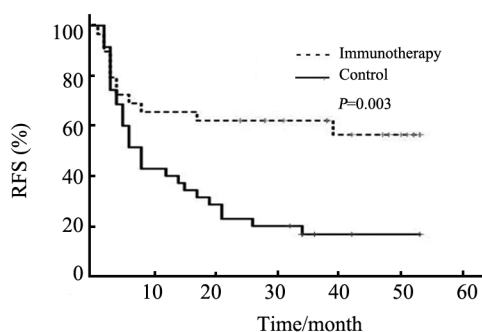


图2 64例肝细胞癌患者RFS的Kaplan-Meier生存分析
Fig.2 Kaplan-Meier analysis of RFS for 64 patients with hepatocellular carcinoma

I~III期患者中,免疫治疗组仅1例复发,而对照组有12例复发,复发率显著降低(7.1% vs 66.7%, $OR=0.038$, $95\%CI: 0.004 \sim 0.368$, $P=0.005$);免疫治疗组2年RFS较对照组显著升高(92.9% vs 33.3%, $P=0.005$),中位PFS较对照组明显延长(38.0 vs 14.5个月, $P=0.005$);截至2020年12月,两组均无死亡病例、OS无显著差异。RFS Kaplan-Meier生存分析曲线见图3。

IV期患者中,免疫治疗组患者的1年、2年PFS分别为40%、33.3%,对照组为29.4%、5.9%,两组中位PFS(6 vs 5个月, $P=0.077$,图4)和中位OS(29 vs 30个月, $P=0.994$)差异均无统计学意义。RFS Kaplan-Meier生存分析曲线见图4。免疫治疗组的9例存活患者中有7例为肝内单中心复发(包括2例伴有肝外转移患者),其中4例维持稳定者均为单纯肝内单中心复发患者。Cox比例风险回归模型分析结果显示,肝内单中心复发与疾病控制率(disease control rate, DCR)明显相关($HR=6.12$, $95\%CI: 1.173 \sim 32$, $P=0.03$)。

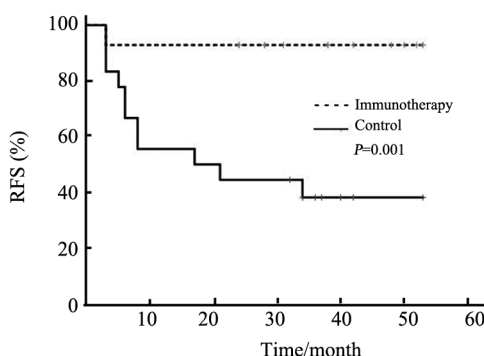


图3 I~III期肝细胞癌患者RFS Kaplan-Meier生存分析
Fig.3 Kaplan-Meier analysis of PFS for stage I-III patients with hepatocellular carcinoma

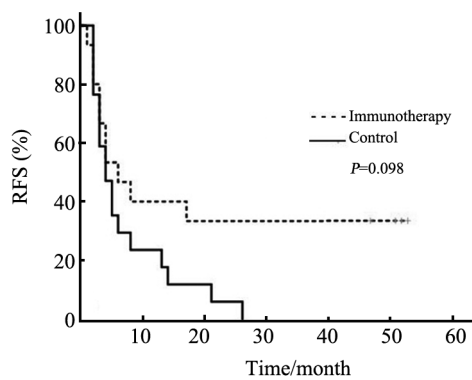


图4 IV期肝细胞癌患者RFS Kaplan-Meier生存分析
Fig.4 Kaplan-Meier analysis of RFS for stage IV patients with hepatocellular carcinoma

2.2 活化自体淋巴细胞AIT对肝细胞癌患者外周血淋巴细胞亚群水平的影响

与治疗前相比,5次输注后(于第6次输注前采血)肝细胞癌患者外周血CTL($CD3^+CD28^+CD8^+$)水平明显升高($P=0.03$),辅助性T细胞($CD3^+CD4^+CD8^-$)水平明显降低($P=0.005$),其余检测的淋巴细胞亚群均未见明显变化(均 $P>0.05$),见表2。

2.3 安全性评价

所有肝细胞癌患者治疗期间均未观察到3级以

上不良反应发生。治疗期间仅2例次患者观察到1级不良反应(1例次肌肉酸痛、1例次乏力),均具有自限性,未予医学干预,24 h内缓解。

3 讨论

肝是人体主要的代谢器官,这使其对新抗原维持较高的暴露率,增加了免疫系统过度激活的风

险^[16-19]。因此,免疫耐受为肝最重要的免疫学特性之一,以防止其对肠道吸收的抗原产生过度的免疫应答。同时50%~80%的肝癌与慢性HBV感染有关^[20],反复的慢性炎症和瘢痕修复(肝纤维化和肝硬化),为肝细胞转化和癌细胞增殖提供了一个免疫抑制环境,肝癌的免疫治疗具有巨大的发展潜力。

表2 免疫治疗组患者治疗前后淋巴细胞亚群变化/%

Tab.2 Changes of lymphocyte subsets in patients of immunotherapy group before and after treatment/%

T-lymphocyte subset	Pre-treatment	Post-treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	37.40±9.11	33.49±7.64	3.15	0.005
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	27.28±10.33	29.38±7.89	-1.21	0.24
CD3 ⁺ CD19 ⁻	70.29±11.06	68.69±11.32	0.85	0.41
CD3 ⁻ CD19 ⁺	10.46±7.64	10.38±8.14	0.09	0.93
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10.60±6.07	11.62±5.72	-1.20	0.24
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	5.29±7.03	4.34±5.80	0.52	0.61
CD3 ⁺ HLA-DR ⁻	61.38±11.83	58.95±12.87	1.65	0.11
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6.77±7.31	8.07±7.22	0.65	0.52
CD3 ⁺ CD28 ⁺ CD8 ⁺	11.23±5.01	13.09±5.95	-2.41	0.03
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	3.26±0.99	3.06±1.38	0.57	0.58

肝癌为高复发风险肿瘤,唐建龙等^[21]研究显示术后1、2、3年RFS分别为42.5%、28.4%、26%。即使是早期肝癌患者,建议参加辅助治疗的临床试验仍得到广泛的医学认可和临床探讨^[22]。

目前肝癌临床研究的主要辅助治疗包括TACE、TKI等治疗。部分研究^[23-25]显示,索拉非尼和TACE在肝癌术后的辅助治疗有PFS及PS获益。而另一些研究^[21,26]并未观察到其术后辅助治疗的临床获益。并且术后辅助性TACE治疗副反应发生率高达42.85%~94.6%,严重的并发症包括急性肝衰竭(0.33%)、肝脓肿(0.33%)和骨髓抑制(3%)^[25]。而索拉菲尼手足综合征等副反应的发生也严重影响其治疗依从性。因此,受限于肝癌患者基础肝功能的影响(肝纤维化,肝硬化等),相比临床获益率,只有部分患者能够耐受辅助性TACE、TKI治疗,且难以长期维持。而AIT也同样在肝癌的辅助治疗中被尝试。不同于其他辅助治疗,由于其针对肿瘤细胞的特异性免疫杀伤作用,其安全性已在许多临床研究中得到了证实,为其在肝癌的临床应用奠定了基础^[27-28]。

本研究通过双刺激技术培养细胞,获得以T细胞(CD3⁺HLA-DR 63%)为主的活化淋巴细胞予以回输。所有不良事件均为1级,且发生率仅为1%。除去因病情进展终止治疗患者,总体治疗依从性为97%,是令人满意的。证明其可以作为肝癌一线治疗后辅助治疗的安全选择。

AIT是一种高度个性化的肿瘤免疫治疗方式。其临床疗效也在肝癌中的多项临床研究被证实。TAKAYAMA等^[14]对150例接受肝细胞癌治愈性切除的患者进行了AIT辅助治疗的研究,其中76例患者接受了活化自体免疫细胞疗法,74例患者没有接受辅助治疗,结果显示,AIT治疗提高了PFS率,但对OS没有影响。Meta分析^[15,29]提示,辅助性AIT在1年、2年、3年和5年的复发率显著低于单纯的观察性治疗,使用随机或固定效应荟萃分析模型也得到了类似的结果。而过继性CIK细胞治疗更是作为肝癌术后的辅助治疗获得CSCO诊疗指南的II级推荐^[30]。

在本研究选取的I~III期肝癌患者中,一线治疗方法不仅仅是肝癌根治性手术,还包括TACE治疗和TKI治疗患者。随访期间,免疫治疗组仅1例手术后患者出现复发(PFS率为92.9%),其余所有患者随访期间均病情稳定并存活,提示DCR与一线治疗方法无明显相关,同时未见与癌栓、肿瘤大小及肿瘤个数等风险相关。而对照组无复发生存率仅为33.3%。两组之间相比,免疫治疗明显降低了I~III期肝癌一线治疗后的复发风险($P<0.05$)。这与之前研究结果相似,同样未观察到两组间OS的统计学差异,考虑与随访时间较短有关。

对于晚期进展期肝癌,系统性治疗仍然为主要治疗手段。目前仅有索拉菲尼有OS的获益^[31],获得临床指南的一线推荐。其他TKI药物的临床研究也

仅仅是弱于索拉菲尼的临床疗效,并没有改善OS。最新的关于阿特珠单抗(Atezolizumab)联合贝伐珠单抗对照索拉菲尼治疗晚期肝癌III期研究的初步报告显示,阿特珠单抗+贝伐珠单抗组与索拉菲尼组的死亡危险比为0.58。阿特珠单抗+贝伐珠单抗组12个月的OS为67.2%,索拉菲尼组为54.6%。两组患者中位PFS分别为6.8个月和4.3个月^[32]。阿特珠单抗+贝伐珠单抗组对比阿特珠单抗单药治疗组的中位PFS为5.6个月和3.4个月^[33],有望改善晚期肝癌患者的OS。

AIT在治疗转移性或不可切除的肝细胞癌方面,临床数据有限。因此,本研究在选择患者方面同时入组了32例进展期肝癌患者。遗憾的是,与对照组相比PFS和OS均未得到统计学意义的差异。免疫治疗组1年、2年PFS率分别为40%、33.3%。1年、2年OS率分别为73.3%、66.7%。数据分析提示,免疫治疗对于进展期肝癌临床疗效未能优于索拉菲尼等其他治疗方法。

值得一提的是,免疫治疗组15例进展期肝癌有7例为肝内单中心复发患者(包括2例伴有肝外转移患者)随访期间全部存活,占全部9例存活患者77.8%,其中4例单纯肝内单中心复发患者随访期间均维持病情稳定。Cox比例风险回归模型分析显示肝内单中心复发与DCR明显相关($P<0.05$)。提示肝内单中心转移患者有可能通过AIT治疗改善临床疗效。

同时从生存曲线可以看出,随着时间的延长,AIT获益患者可以产生持续的肿瘤控制作用,这一点也同样在转移性黑色素瘤研究中得到证实^[34-35]。而LEE等^[12]研究显示CIK过继性细胞免疫治疗在肝癌的辅助治疗中对RFS和OS显著改善持续了5年以上。产生这一现象的机制目前并不清楚是否与改变肿瘤周围的免疫环境有关。因为在本研究中,观察到细胞输注后患者外周血淋巴细胞亚群的部分改变。与治疗前相比,多次细胞输注后患者外周血CD3⁺CD28⁺CD8⁺细胞呈进行性升高($P<0.05$)。

蔡洁等^[36]对30例慢性乙肝患者外周血进行检测发现,慢性乙肝患者CD8⁺CD28⁺T淋巴细胞显著低于正常对照组。认为慢性乙肝患者外周血淋巴细胞中,T淋巴细胞表面的CD28表达水平较正常人明显降低,从而导致B7/CD28共刺激通路异常,T细胞活化低下,使肝处于相对免疫耐受状态,证实T细胞CD28低表达与肝免疫耐受密切相关。免疫治疗中,通过上调CD28⁺CD8⁺T细胞表面的表达,可能是改善肝免疫耐受的一个有效途径^[36]。

最近的研究^[37]表明,HBV免疫耐受的肝癌患者发展

为肝癌(10年内约12%)相比经过治疗的“免疫活性”患者发展为肝癌(10年内约6%)的比例更高。值得注意的是,累计免疫介导的肝细胞损伤较多的患者将更容易发生肝癌。而患者肿瘤微环境改变^[38-39],使耗尽的CD8⁺T细胞无法有效产生细胞因子,导致慢性HBV复制,并与由此导致的肝细胞癌进展有关。

本研究中通过自体淋巴细胞的输注观察到了CD28⁺CD8⁺T细胞比例的升高,提示该治疗有可能通过上调CD28⁺CD8⁺T细胞表面的表达,改善了肝免疫耐受状态,而达到杀灭肿瘤细胞的效应。

但是CD28⁺CD8⁺T细胞杀伤肿瘤作用主要通过直接接触靶细胞实现,研究^[40-41]显示肿瘤核心部位的CD8⁺T细胞数量远低于外皮层部位,表明CD8⁺T细胞浸润效率低下。此外,克隆性CD8⁺T细胞更容易表现出衰竭表型,尤其是在晚期肝癌中。与早期肝癌患者相比,晚期肝癌患者中CD8⁺T细胞衰竭趋势更为明显^[41]。肿瘤微环境促进了CD8⁺T细胞向衰竭的转变,这也提示其可能是对进展期肝癌疗效欠佳。

本研究也证实了I~III期肝癌患者一线治疗后通过AIT有望获得长期的临床缓解,而进展期肝癌的临床获益有限。以上证据均提示微转移性肝癌细胞更适合成为AIT的主要靶细胞,围手术期可能是改变肿瘤免疫耐受状态、提高AIT疗效的最佳时期。

综上所述,笔者认为活化自体免疫细胞疗法可作为I~III期肝癌患者一线治疗后一种安全且有效的辅助治疗。本研究治疗次数有限,如果使用更强化治疗有望使无复发状态长期维持,进一步提高OS率。而对于进展期肝癌,AIT治疗仍有待于进一步的研究改进,例如确定最佳的时间表,联合已知免疫调节剂(免疫检查节点)的使用,以及开发更有效的效应剂,以期在不久的将来可以降低复发率,提高生活质量,延长OS,改善晚期肝癌的预后。

[参考文献]

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.008.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [3] FENG L H, DONG H, LAU W Y, et al. Novel microvascular invasion-based prognostic nomograms to predict survival outcomes in patients after R0 resection for hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(2): 293-303. DOI: 10.1007/s00432-016-2286-1.
- [4] DU M, CHEN L, ZHAO J, et al. Microvascular invasion (MVI) is a poorer prognostic predictor for small hepatocellular carcinoma[J].

- OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 38 [2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3922738/>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-38.
- [5] MARRERO J A, KULIK L M, SIRLIN C B, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American association for the study of liver diseases[J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 723-750. DOI: 10.1002/hep.29913.
- [6] SHARMA P, ALLISON J P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential[J]. *Cell*, 2015, 161(2): 205-214. DOI:10.1016/j.cell.2015.03.030.
- [7] SIA D, JIAO Y, MARTINEZ-QUETGLAS I, et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3): 812-826. DOI:10.1053/j.gastro.2017.06.007.
- [8] XU L, WANG J, KIM Y, et al. A randomized controlled trial on patients with or without adjuvant autologous cytokine-induced killer cells after curative resection for hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(3): e1083671 [2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141337/>. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1083671.
- [9] CAI X R, LI X, LIN J X, et al. Autologous transplantation of cytokine-induced killer cells as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma in Asia: an update meta-analysis and systematic review[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31318-31328. DOI: 10.18632/oncotarget.15454.
- [10] XIE F, ZHANG X, LI H, et al. Adoptive immunotherapy in postoperative hepatocellular carcinoma: a systemic review[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42879 [2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916174/>. DOI:10.1371/journal.pone.0042879.
- [11] ZHONG J H, MA L, WU L C, et al. Adoptive immunotherapy for postoperative hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. *Int J Clin Pract*, 2012, 66(1): 21-27. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2011.02814.x.
- [12] LEE J H, LEE J H, LIM Y S, et al. Sustained efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma: an extended 5-year follow-up[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(1): 23-32. DOI: 10.1007/s00262-018-2247-4.
- [13] YOON J S, SONG B G, LEE J H, et al. Adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy for hepatocellular carcinoma: a propensity score-matched analysis of real-world data[J/OL]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 523 [2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31151419/>. DOI:10.1186/s12885-019-5740-z.
- [14] TAKAYAMA T, SEKINE T, MAKUUCHI M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial [J]. *Lancet*, 2000, 356(9232): 802-807. DOI:10.1016/S0140-6736(00)02654-4.
- [15] YUAN B H, LI R H, YUAN W P, et al. Harms and benefits of adoptive immunotherapy for postoperative hepatocellular carcinoma: an updated review [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 18537-18549. DOI:10.18632/oncotarget.14507.
- [16] HEYMANN F, TACKE F. Immunology in the liver: from homeostasis to disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(2): 88-110. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.200.
- [17] TRIVEDI P J, ADAMS D H. Gut-liver immunity[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(5): 1187-1189. DOI:10.1016/j.jhep.2015.12.002.
- [18] HORST A K, NEUMANN K, DIEHL L, et al. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3): 277-292. DOI:10.1038/cmi.2015.112.
- [19] THOMSON A W, KNOLLE P A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11): 753-766. DOI:10.1038/nri2858.
- [20] VENOOK A P, PAPANDREOU C, FURUSE J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective [J]. *Oncologist*, 2010, 15 (suppl 4): 5-13. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-S4-05.
- [21] 唐建龙. 肝细胞癌切除术后早期复发因素与生存预后分析[D]. 广州: 广州医科大学, 2020.
- [22] LLOVET J M, DI BISCEGLIE A M, BRUIX J, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(10): 698-711. DOI:10.1093/jnci/djn134.
- [23] HUANG Y, ZHANG Z, ZHOU Y, et al. Should we apply sorafenib in hepatocellular carcinoma patients with microvascular invasion after curative hepatectomy? [J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 541-548[2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30666133/>. DOI:10.2147/ott.s187357.
- [24] 曹新岭, 周成明, 姚刚, 等. 两种方法辅助治疗对根治术后肝细胞癌伴微血管侵犯患者生存时间及复发风险影响[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(11): 1319-1320,1322. DOI:10.16680/j.1671-3826.2020.11.19.
- [25] HUO Y R, CHAN M V, CHAN C. Resection plus post-operative adjuvant transcatheter arterial chemoembolization (TACE) compared with resection alone for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2020, 43(4): 572-586. DOI:10.1007/s00270-019-02392-6.
- [26] 向波. 早期肝癌的疗效及预后的影响因素分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [27] JAFFERJI M S, YANG J C. Adoptive T-cell therapy for solid malignancies[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2019, 28(3): 465-479. DOI:10.1016/j.soc.2019.02.012.
- [28] MET Ö, JENSEN K M, CHAMBERLAIN C A, et al. Principles of adoptive T cell therapy in cancer[J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(1): 49-58. DOI:10.1007/s00281-018-0703-z.
- [29] CAO J, KONG F H, LIU X, et al. Immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(27): 3649-3663. DOI:10.3748/wjg.v25.i27.3649.
- [30] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 原发性肝癌诊疗指南 2020 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
- [31] BANGARU S, MARRERO J A, SINGAL A G. Review article: new therapeutic interventions for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 51(1): 78-89. DOI: 10.1111/apt.15573.
- [32] FINN R S, QIN S K, IKEDA M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-1905. DOI:10.1056/NEJMoa1915745.
- [33] LEE K H, LEE M S. Atezolizumab plus bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma-Authors' replays[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(9): e413 [2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32888463/>. DOI:10.1016/s1470-2045(20)30476-9.

- [34] ROSENBERG S A, YANG J C, SHERRY R M, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13): 4550-4557. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-11-0116.
- [35] ANDERSEN R, DONIA M, ELLEBAEK E, et al. Long-lasting complete responses in patients with metastatic melanoma after adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and an attenuated IL2 regimen[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15): 3734-3745. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-1879.
- [36] 蔡洁, 刘源, 韩亚萍, 等. 慢性乙肝患者外周血淋巴细胞表面 CD28 的表达[J]. *放射免疫学杂志*, 2008, 21(5): 467-468. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9810.2008.05.048.
- [37] KIM G A, LIM Y S, HAN S, et al. High risk of hepatocellular carcinoma and death in patients with immune-tolerant-phase chronic hepatitis B[J]. *Gut*, 2018, 67(5): 945-952. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314904.
- [38] ZHU H, CAO X. NLR members in inflammation-associated carcinogenesis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5): 403-405. DOI: 10.1038/cmi.2017.14.
- [39] WANG Q, PAN W, LIU Y, et al. Hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cells maintain functional exhaustion after antigen reexposure in an acute activation immune environment[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 219[2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816053/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.00219.
- [40] ZHENG C, ZHENG L, YOO J K, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1342-1356. DOI:10.1016/j.cell.2017.05.035.
- [41] JIANG Y, LI Y, ZHU B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1792[2021-06-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26086965/>. DOI: 10.1038/cd-dis.2015.162.

[收稿日期] 2021-06-26

[修回日期] 2021-09-29

[本文编辑] 黄静怡