肿瘤可溶性抗原和金葡菌超抗原构建肿瘤疫苗的基础研究及临床应用

王　刚　张庆波　张世伟　王明军　陈　力　张晋冀　徐卫国*

摘要　目的　探讨肿瘤疫苗在临床应用效果，分析有效成分，为进一步纯化肿瘤疫苗打下良好基础。**方法**　提取肺部肿瘤临床标本的可溶性抗原，和金葡菌超抗原等共同构建肿瘤疫苗，对112例肺癌术后患者（治疗组56例，对照组56例），经3～10年随访，观察临床效果；分离提取肿瘤标本中的膜蛋白、DNA、RNA、HSP70以及多肽，分析其有效成分。**结果**　治疗组患者5年生存率高于对照组，其差异有统计学意义（$P<0.01$）；治疗组患者未见全身及局部明显毒副作用；该疫苗的主要有效成分是多肽，膜蛋白也具有免疫活性。**结论**　用该方法构建的肿瘤疫苗用于肺癌术后患者可提高5年生存率，患者耐受性好；该疫苗的主要有效成分是多肽和膜抗原。

关键词　可溶性肿瘤抗原；金葡菌超抗原；肿瘤疫苗；肺肿瘤
中图分类号　R734.3　　**文献标识码**　B　　**文章编号**　1007－9564(2013)07－1054－03
DOI **编码**　10.11723/mtgyyx 1007－9564 201307003

LAB RESEARCH AND CLINICAL APPLICATION OF TUMOR VACCINE WITH TUMOR SOLUBLE ANTIGEN AND STAPHYLOCOCCUS SUPERANTIGEN

Wang Gang, Zhang Qingbo, Zhang Shiwei, et al. Department of Oncology, Hebei united University Affiliated Kailuan Hospital, Tangshan 063000, China

Abstract　Objective　To explore the effect of tumor vaccine with tumor soluble antigen and staphylococcus superantigen and its effective components. **Methods**　Tumor vaccine was made with tumor soluble antigen and staphylococcus superantigen and its effective components was analyzed immunologically. One hundred and twelve patients with lung cancer after operation was studied and followed up for 3－10 years(56 patients treated with the vaccine as experiment group and 56 patients without other treatment as control). **Results**　The 5－year survival rate in experiment group was higher than that in control group ($P<0.01$). Significant toxic and side effect did not appear. Effective components were peptides as well as membrane protein. **Conclusion**　The vaccine can improve 5－year survival rate of lung cancer patients after operation and it is well tolerated by patients in treatment. The effective components of the vaccine are peptides and membrane.

Key words　Tumor soluble antigen; Staphylococcus superantigen; Tumor vaccine; Lung neoplasms

恶性肿瘤复发和转移一直是临床亟待解决的重要难题，为此我们于1998—2007年用临床肿瘤标本提取肿瘤可溶性抗原（tumor soluble antigen，TSA），配合金葡菌超抗原和IL－2，共同构建肿瘤疫苗，用于肺部肿瘤术后患者，以减少肿瘤复发和转移，延长生存期，提高肿瘤患者的生存质量；并对肿瘤可溶性抗原有效成份进行免疫分析。经3～10年的随访观察，取得了较好的临床效果。现将实验研究和临床应用结果报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　将112例术后早期肺癌患者随机分为疫苗治疗组和对照组。疫苗治疗组56例，男45例，女11例；年龄40～72岁，平均(55.3±5.2)岁；其中腺癌21例，磷癌20例，小细胞肺癌5例，大细胞肺癌10例。56例对照组，男46例，女10例；年龄43～74岁，平均(57.5±5.6)岁；其中腺癌20例，磷癌22例，小细胞肺癌6例，大细胞肺癌8例。二组临床资料比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。对照组术后进行常规辅助治疗，疫苗治疗组在术后常规辅助治疗基础上加用肿瘤疫苗。

1.2　TSA的制备　为了确定可溶性抗原的有效成分，我们提取肺癌患者本人被切除的瘤体组织细胞

基金项目：河北省科学技术研究与发展计划项目（编号：09276418D－18）

作者单位：河北省唐山市，河北联合大学附属医院肿瘤外科研究生，现就职于开滦总医院肿瘤科（王刚）；河北联合大学生物科学系（张庆波）；河北联合大学附属医院肿瘤外科（张世伟、陈力、张晋冀、徐卫国）；河北联合大学附属医院肿瘤外科研究生，现就职于开滦总医院普外科（王明军）
*通讯作者

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的细胞膜抗原(mAg)、热休克蛋白 70(HSP70)、DNA、RNA 和细胞内多肽(Peptides),并用于诱导外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)增殖,培养 6d,用^{3}H－Tdr 掺入法测定细胞增值[1]。

1.3 肿瘤疫苗制备 方法见参考文献[2]。

1.4 高聚金葡素 由沈阳协合生物制药股份有限公司生产。

1.5 接种计划 每个疗程共 2 次:首次于术后第八天接种,间隔 10d 再进行第二次接种。

1.6 接种效果的近期判定 于 24～48h 观察局部反应。阳性:局部红肿或伴有硬结;阴性:局部无红肿或硬结,结果接种阳性为有效。

1.7 接种方法 皮内注射。于双前臂掌侧,左右各一个点,每侧注射 0.1ml。用药前、后 1d 及当天(共 3d)分别静滴 20 万 U 的 IL－2。

2 结果

2.1 肺癌抗原免疫活性成分分析 见表 1。刺激指数(SI)＝试验组 cpm 数/对照组 cpm 数,SI≥2 表示细胞增值。

表 1 肿瘤可溶性抗原免疫活性成分分析

抗原	刺激指数(SI)				
(μg/ml)	膜抗原	Hsp70	DNA	RNA	多肽
8	2.39	1.32	1.12	0.43	3.83
4	2.10	1.10	1.13	1.82	4.65
2	1.71	0.93	0.83	0.46	4.34
1	0.80	0.62	0.95	0.63	5.85
0.5	0.72	0.71	0.94	0.40	6.71
0.25	1.42	0.85	2.10	0.26	3.46
0.125	0.72	0.92	1.23	0.40	2.23

上述实验结果显示:我们提取的肺癌可溶性抗原能够诱导 PBMC 增值,表明 TSA 具有免疫原性。其主要活性成分是多肽、细胞膜蛋白,其他成分则不具有免疫原性。

2.2 不同刺激物对 PBMC 增殖活性的影响 见表 2。分别用 TSA、高聚金葡素 TSA＋高聚金葡素、TSA＋高聚金葡素＋IL－2 刺激外周血单个核细胞(PBMC)(4μg TSA;100U 高聚金葡素,500U IL－2),用 MTT 法测定细胞增殖。

上述结果表明,高聚金葡素和 TSA 联合应用,能显著增强 PBMC 的增殖活性,加入 IL－2 后使其增殖活性增加,并能延长细胞增殖活性。

2.3 局部反应 注射接种部位均有疼痛和烧灼感,接种 20min 后均有注射局部的红、肿、热、痛、急性反应,4 例 24h 后完全消退;52 例在 48h 后转为硬结,直径 5～29mm,72h 逐渐消退。

2.4 全身反应 15 例在注射疫苗后出现低热,＜38℃,未做任何处理,次日消退。IL－2 静滴后,28 例出现高热,体温 38～39℃,未做处理 4～6h 后消退,用安痛定 2ml 肌注,2～3h 消退,未见过敏性休克和其他不良反应。

表 2 不同刺激物对 PBMC 增殖活性的影响

刺激物	刺激指数(SI)		
	3d	6d	9d
TSA	2.52	2.81	1.95
高聚金葡素	2.89	3.18	2.15
TSA＋高聚金葡素	6.63	7.85	5.12
TSA＋高聚金葡素＋IL－2	7.12	8.06	10.51

2.5 疫苗治疗随访结果 对疫苗接种患者和对照组患者进行了 3～10 年的随访观察,观察结果见表 3。

上述随访观察结果显示:疫苗治疗组总生存率显著高于对照组($P<0.01$);腺癌组明显高于对照组($P<0.05$)。

表 3 二组早期肿瘤患者 5 年生存率比较(%)

组别	n	腺癌	磷癌	小细胞肺癌	大细胞肺癌	总生存率
治疗组	56	17/21(80.9)*	18/20(90.0)	2/5(40.0)	5/10(50.0)	42/56(75.0)**
对照组	56	9/20(45.0)	14/22(63.6)	1/6(16.7)	2/8(25.0)	26/56(46.4)

注:二组对比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

免疫疗法分为被动免疫和主动免疫。被动免疫指在体外合成各种免疫活性物质,这些物质在体内不需依赖宿主的免疫系统就可以发挥功能,被动免疫治疗中应用最为广泛的是单克隆抗体,例如西妥昔单抗、曲妥株单抗、贝伐单抗等[3－6]。与之相反,主动免疫利用宿主的免疫细胞并且需要完整的免疫系统才能发挥功能。肿瘤疫苗接种治疗属于肿瘤主动免疫治疗,它除了具有传统意义上预防功能外,同时可以调动机体免疫系统,对肿瘤细胞产生杀伤力,是生物治疗的主要方法之一,它在预防和治疗肿瘤术后的转移和复发方面效果会更好[7]。

1991 年 Hauna 报道结肠癌患者经肿瘤疫苗治疗后能明显提高 5 年生存率,1992 年美国学者报道黑色素瘤免疫治疗后的 5 年生存率提高了 20%[8],肿瘤疫苗治疗[9,10]以其系统的理论、广泛的基础研

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究作支持，已成为治疗肿瘤的第四模式，我们曾报道，用 TSA 和抗 CD3 单抗共同诱导 PBMC，产生杀瘤性的免疫效应细胞（TAK 细胞），是肿瘤过继细胞免疫治疗的新方法，并在基础研究和临床应用中取得了良好的效果[11－13]。但在这种细胞的诱导过程中，使用的 CD－McAb 来源于小鼠，不能直接用于人体，因此不能将 CD－McAb、TCA 和 IL－2 联合构建肿瘤疫苗防治肿瘤。为了探讨肿瘤过继免疫治疗和研制肿瘤疫苗的新方法，我们采用一种以能用于人体内的金葡菌超抗原（高聚金葡素）代替 CD－McAb，联合 TSA 和 IL－2 共同诱导 PBMC，产生了良好的实验效果。并且确定了 TSA 的主要活性部分是多肽，细胞膜抗原也具有弱免疫活性，此研究结果为进一步纯化肿瘤疫苗提供了实验基础。

肺癌术后进行放化疗会损伤人体免疫系统功能，术后一些微小病灶在人体免疫低下时具有高度危险性，此时应用肿瘤疫苗效果显著[14]。抗肿瘤免疫主要是细胞免疫，是否能诱导出细胞免疫以及免疫反应的强弱是判断制备肿瘤疫苗成功与否的重要指标。皮内迟发型变态反应试验是判断机体细胞免疫反应状况的常用方法。用我们制备的肿瘤疫苗给患者进行皮内接种，进行短期临床观察发现，有 52 例出现硬结、72h 后逐渐消退，未见明显的全身反应。经过 3～10 年的临床随访观察，与对照组相比，肿瘤疫苗治疗组患者的 5 年生存率明显的提高。从而表明我们研制的疫苗能够明显诱导机体的细胞免疫反应，延长肿瘤患者的生存期。Stanford JL 等[15]应用牝牛分枝杆菌疫苗（SRL172）对肺腺癌患者进行治疗，亦发现应用 SRL172 可延长肺腺癌患者中位生存时间。国内有关肺癌肿瘤疫苗治疗方面临床研究较少。朱利明等[16]指出肿瘤抗原致敏树突状细胞疫苗联合热疗治疗晚期非小细胞肺癌总体耐受性良好，亦可见临床获益，其临床价值有待进一步探讨。

免疫治疗对人体正常组织和细胞损伤轻微，对已经发生播散的微小病灶有效，与传统术后辅助治疗相比，免疫治疗是一种更有前途的治疗模式。但人体免疫系统极其复杂，人们对免疫系统的了解并不全面，肿瘤疫苗对不同病理类型及晚期肺癌患者的治疗效果，还有待进一步研究。

4　参考文献

[1] Rotzschke O, Falk K. Naturally－occurring peptide antigens derived from the MHC class I restricted processing pathway[J]. Immunol Today, 1991, 12(12): 447－455

[2] 张庆波，刘丽华，边洪荣，等. 卵巢癌抗原等诱导杀瘤性免疫细胞的实验研究[J]. 实用癌症杂志，1999，12(14)：22－24

[3] Isobe T, Herbst RS, Onn A. Current management of advanced non－small cell lung cancer: targeted therapy[J]. Semin Oncol, 2005, 32(3): 315－328

[4] Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non－small－cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3235－3242

[5] Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(11): 2445－2459

[6] Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti－vascular endothelial growth factor monoclonals in non－small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(12 Pt 2): 4258s－4262s

[7] 张叔人. 肿瘤疫苗临床研究现状及启示[J]. 中华医学杂志，2005，85(46)：3307－3310

[8] Chares E. Tumor vaccine treatmant of malignant tumor[J]. Science, 1994 (tumor vaccine special issue): 88

[9] Schlom J, Gulley, Arlen PM. Role of vaccine therapy in cancer: biology and practice[J]. Curr Oncol, 2007, 14(6): 238－245

[10] Eager R, Harle L, Nemunaitis JJ. Lung cancer vaccines[J]. Curr Gene Ther, 2007, 7(6): 469－484

[11] 张庆波，石卫，李艳芬，等. 卵巢癌抗原和抗 CD3 单抗体外共同诱导产生细胞的实验研究[J]. 实用肿瘤学杂志，1997，11(4)：257－258

[12] 张庆波，李艳芬，陈金栋. 可溶性卵巢癌抗原和抗 CD3 单抗共同激活的杀瘤性细胞的实验研究[J]. 中国肿瘤生物杂志，1995，2(4)：262

[13] 张庆波，万云霞，翟红，等. 卵巢癌可溶性抗原和抗 CD3 单克隆抗体诱导细胞毒 T 细胞抗人卵巢癌的实验研究[J]. 中华妇产科杂志，1998，33(6)：355

[14] Hirschowitz EA, Yannelli JR. Immunotherapy for Lung Cancer[J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(2): 224－232

[15] Stanford JL, Stanford CA, O'Brien ME, et al. Successful immunotherapy with Mycobacterium vaccae in the treatment of adenocarcinoma of the lung[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(2): 224－227

[16] 朱利明，张沂平，余新民，等. 肿瘤抗原致敏树突状细胞疫苗联合热疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2008，15(1)：66－69

[2013—05—06 收稿　2013—05—15 修回]

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net