DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2020.03.007

·论著:消化系统疾病·

腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术联合DC-CIK治疗胃癌及对血清CA19-9、SRF的影响

杨晓晔,豆发福,李 恒
(三二〇一医院胃肠外科,陕西 汉中 723000)

摘 要: 为探讨腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术联合细胞免疫(DC-CIK)治疗胃癌及对血清CA19-9、SRF的影响,按随机数字表法将胃癌患者随机分为两组。对照组行腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术,观察组在对照组基础上联合DC-CIK治疗。比较两组患者的临床疗效及相关实验室指标。结果显示,观察组的缓解率(ORR)显著高于对照组。术后1个月后,两组T细胞亚群均显著改善,与对照组相比,观察组的$CD3^+$、$CD4^+$以及$CD4^+/CD8^+$显著升高,$CD8^+$显著降低。血清CA 19-9和组织SRF蛋白显著降低。治疗后1年的复发率显著降低。结果说明,腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术联合DC-CIK可增强胃癌的治疗效果,降低可复发率。

关键词: 胃癌; 腹腔镜; DC-CIK治疗; 糖类抗原19-9; 血清应答因子
中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A

中晚期胃癌(gastric cancer)患者术后复发率高,同时预后较差[1]。近年来免疫治疗是肿瘤治疗的研究热点,如DC-CIK细胞输注疗法可以改善接受化疗治疗的胃癌效果和预后[2],但是国内极少关于DC-CIK疗法联合全胃切除术的治疗的研究。糖类抗原19-9(Carbohydrate antigen 19-9,CA19-9)作为一种肿瘤标志物(Tumor Marker)具有帮助诊断恶性肿瘤、帮助判断患者肿瘤严重程度,具有帮助判断胃癌预后的作用[3]。血清应答因子(serum response factor,SRF)与肿瘤的血管生成、肿瘤细胞的迁移和侵袭有关[4],但是否与胃癌发病有关,报道尚较少。本研究拟探讨腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术联合DC-CIK细胞输注疗法对中晚期胃癌的临床疗效,进一步检测和分析其对血清CA19-9和组织中SRF的水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料

经本院伦理委员会批准,选择2016年4月至2017年4月间于本院进行诊断治疗的胃癌患者90例作为研究对象,男57例,女33例,年龄40~75岁。将以上患者按照随机数表法分为两组,对照组给予腹腔镜辅助D2根治术治疗,观察组在对照组基础上联合DC-CIK治疗,每组45例。

收稿日期:2019-01-31;修回日期:2019-12-04

对照组男29例,女16例,年龄39~74岁,平均(59.32±3.95)岁,TNM分期Ⅱ期19例,Ⅲ期26例;观察组男28例,女17例,年龄39~74岁,平均(58.67±4.03)岁,TNM分期Ⅱ期17例,Ⅲ期28例。两组的一般资料无显著差异,具有可比性。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准:(1)年龄在18~75岁之间;(2)经病理学检测确诊为胃癌并且符合可接受全胃切除术治疗的标准[5];(3)预计生存期大于3个月;(4)资料完整;(5)签署临床研究研究知情同意书。

排除标准:(1)非首次确诊且为原发性胃癌;(2)合并其他原发性肿瘤;(3)接受过放疗、化疗等治疗;(4)合并其他脏器或消化系统严重疾病;(5)合并免疫系统疾病。

1.3 腹腔镜辅助D2根治术

建立治疗小组,均由具有多年临床经验的医师组成,两组患者均由治疗小组完成。对照组和观察组患者均接受,患者采取平卧位,进行全身麻醉,行脐孔穿刺,建立人工气腹压,术中患者的气腹压维持在2.0 kPa之间。经脐孔置入10 mm套管针与镜头,探查腹腔,于腹腔外侧下左侧腋前线肋缘下2 cm处作主切口和辅助操作孔,之后置入器械。分别于患者的脐横线交点偏上2 cm、右侧前线肋缘下2 cm处、右侧锁骨中线2 cm处分别做3个规格为5 mm的辅操作孔,采取超声刀将胃结肠韧带、大网膜、脾胃韧带切断,使相关动静脉游离,同时依次切断肝胃韧带以及胃部右动静脉,直到全胃游离,探

查腹腔并明确肿瘤的相关情况,行 D2 淋巴结清扫。腹腔镜下全胃切除术的区域清扫主要是将结肠系膜前叶包膜剥离,将胃幽门上小网膜及胃体大弯网膜的血管及韧带进行分离,再对胃大弯脾门处、胃幽门上小网膜处、胃窦幽门下、胃体大弯网膜处、胰腺上缘淋巴结数目进行清扫。腹部正中作长约 6 ~ 8 cm 辅助切口,进入腹腔内,将十二指肠残端切断,进行远端胃切除操作,并采取毕Ⅰ/Ⅱ式吻合术。清洗腹腔后置入引流管,关闭腹腔结束手术。

1.4 DC-CIK 细胞免疫细胞的制备

通过参考文献[6]制备 DC 细胞核 CIK 细胞。在术前抽取外周全血 100 mL,经梯度离心分离单核细胞,将细胞在 RPMI 1640 培养基中培养,培养条件为于 37 ℃,5% 的 CO_2,培养相关试剂购自 GIBCO 公司(USA)。在培养的第一天在培养基中加入粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF, 75 ng/mL)和重组人白细胞介素 4(rhIL-4, 50 ng/mL),在第四天加入肿瘤抗原(40 μg/mL)在第 5 天加入肿瘤坏死因子(TNF-α, 50 mg/mL),在第 7 天收获抗原负载成熟的 DC 细胞。收集非贴壁细胞并将细胞稀释为 1×10^6 个/mL,加入 γ-干扰素(1000 U/mL)和重组人白细胞介素 2(rhIL-2, 1 000 U/mL),并每隔 3 天加入 rhIL-2(2 500 U/mL),在第 10 天和第 12 天收获 CIK 细胞。所有细胞均经过流式细胞术检测,并在注射前进行病毒、细菌、真菌和支原体检测为阴性。在术后第一个疗程腹股沟淋巴结周围区皮下注射 DC-CIK 细胞,每次不少于 1×10^{10} 个细胞,12 天为一个疗程,进行 2 ~ 3 个疗程。

1.5 T 细胞亚群的测定

分别在治疗前和治疗后 1 个月抽取外周静脉血 10 mL,其中 5 mL 使用流式细胞术检测外周血中 T 细胞亚群,包括 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$以及 $CD4^+/CD8^+$。流式细胞仪为美国 Becton Dickerson, SanJose,使用公司配套试剂盒,严格按照说明书方法操作;

1.6 Western blot 检测胃癌组织 SRF 蛋白的表达

简略步骤:分别在治疗前和治疗后 1 个月采集胃标本,裂解细胞后,在 12 000 rpm,4 ℃下离心 15 min 收集上清液,使用 BCA 方法绘制标准曲线以确定蛋白质浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶并用于电泳,电泳后使用 PVDF 膜进行转膜(Bio-Rad, USA)并在室温下用 5% 无脂牛奶封闭 2h。加入一抗室温震荡 2 h,后在 4 ℃孵育过夜,加入二抗,室温下孵育 1.5 ~ 2 h,使用 ECL 试剂(Huiying, Shanghai, China)进行化学发光检测。使用 GAPDH 作为内参。相关试剂均购买于美国 Abcam 公司。

1.7 酶联免疫法(ELISA)检测血清 CA19-9

采用酶联免疫法(ELISA)检测检测血清中 CA19-9 的浓度,将 5 mL 标本离心取上层血清,该试剂盒购自 Cusabio Biotech Co., Ltd。(中国武汉)。根据说明书加入酶标记试剂和显色剂,并通过加入终止溶液终止反应。通过使用酶标仪(Model 680, Bio-Rad, USA)测定 450 nm 处的光密度。

1.8 观察临床疗效

两组治疗后根据 RECIST 标准评价肿瘤结果,包括完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、稳定(stable disease, SD)、进展(progressive disease, PD),并计算客观缓解率(Objective Response Rate, ORR)=(CR+PR)/总例数×100%。

1.9 复发率及其不良反应

在治疗期间关注患者手术不良反应的发生情况,并及时处理;使用电话随访的方式观察术后 6 个月和第 12 个月复发率和了解术后不良反应。

1.10 统计学处理

本研究的数据分析采用 spss19.0 进行,计数资料以% 来表示,采用秩和检验或 χ^2 检验比较,计量资料以均数±标准差进行正态分布检验,组间两两比较使用 t 检验,统计结果以 $P<0.05$ 视为具有统计学差异。

2 结　　果

2.1 两组临床疗效比较

两组的临床疗效有显著差异,观察组的治疗 ORR 显著高于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1　两组临床疗效比较　(例,%)

组别	CR	PR	SD	PD	有效率
对照组	26(57.78)	11(24.44)	8(17.78)	0(0)	37(82.22)
观察组	30(66.67)	14(31.11)	1(2.22)	0(0)	44(97.78)[a]

与对照组相比,[a]$P<0.05$($n=45$)

2.2 两组 T 细胞亚群比较

术前三组的 T 细胞亚群分布无显著差异($P>0.05$),术后 1 个月后均显著改善($P<0.05$),术后观察组的 $CD3^+$、$CD4^+$以及 $CD4^+/CD8^+$显著高于对照组,$CD8^+$显著低于对照组($P<0.05$),见表 2。

表2 两组T细胞亚群比较

组别	$CD3^+$(%)		$CD4^+$(%)		$CD8^+$(%)		$CD4^+/CD8^+$	
	治疗前	治疗后1个月	治疗前	治疗后1个月	治疗前	治疗后1个月	治疗前	治疗后1个月
对照组	61.65±6.33	68.77±7.43	33.74±5.74	38.62±5.94	32.53±3.53	29.44±2.76	1.02±0.11	1.33±0.15
观察组	60.58±6.64	74.52±7.85[a]	34.26±5.75	43.75±6.35[a]	32.97±3.24	25.54±2.35[a]	1.01±0.12	1.75±0.22[a]

与对照组相比,[a]$P<0.05$($n=45$)

2.3 两组血清CA 19-9比较

治疗前两组血清CA 19-9无显著差异($P>0.05$),治疗后均显著降低($P<0.05$),治疗后观察组的血清CA 19-9显著低于对照组($P<0.05$),见表3。

表3 两组血清CA 19-9比较 (U/mL)

组别	治疗前	治疗后1个月
对照组	43.56±7.72	36.32±6.78
观察组	45.63±7.83	24.32±4.68[a]

与对照组相比,[a]$P<0.05$($n=45$)

2.4 两组组织SRF水平比较

治疗前两组组织SRF蛋白相对表达量无显著差异($P>0.05$),治疗后均显著降低($P<0.05$),治疗后观察组的组织SRF蛋白相对表达量显著低于对照组($P<0.05$),见表4。

表4 两组组织SRF蛋白相对表达量比较

组别	治疗前	治疗后1个月
对照组	4.33±1.06	3.11±1.17
观察组	4.41±0.98	2.25±0.78[a]

与对照组相比,[a]$P<0.05$($n=45$)

2.5 两组不良反应及复发情况比较

观察组无高热、胸闷、过敏和休克等不良反应出现,有5例低热,经物理降温治疗后恢复,并出现1例一过性寒战,两组不良反应发生情况无显著差差异($P>0.05$)。在治疗后1年观察组的复发率显著低于对照组($P<0.05$),见表5。

表5 两组不良反应及复发情况比较 (例,%)

组别	高热	低热	寒战	6个月复发率	1年复发率
对照组	0(0.00)	5(11.11)	1(2.22)	5(11.11)	13(28.89)
观察组	0(0.00)	1(2.22)	0(0.00)	3(6.67)	6(13.33)[a]

与对照组相比,[a]$P<0.05$($n=45$)

3 讨 论

肿瘤的过继细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy,ACI)主要是利用DC细胞和CIK细胞等对肿瘤进行治疗,是最有前景的治疗方法之一。过往研究结果显示DC-CIK胃癌具有较好治疗效果和预后[7-10]。本次研究结果显示两组的临床疗效有显著差异,观察组的治疗ORR显著高于对照组。观察组无高热、胸闷、过敏和休克等不良反应出现,有5例低热,经物理降温治疗后恢复,并出现1例一过性寒战,两组不良反应发生情况无显著差差异。在治疗后1年观察组的复发率显著低于对照组。单核细胞可通过体外通过GM-CSF等诱导胃DC细胞,DC细胞作为最主要的专职抗原提呈细胞,可通过呈递肿瘤抗原诱导机体产生抗原特异性细胞毒T细胞,从实现杀伤肿瘤细胞的效果[11]。而CIK细胞则会通过分泌细胞因子实现杀伤肿瘤细胞的作用,DC细胞与CIK细胞同时输注具有更好的抗肿瘤作用[12]。等研究也显示DC-CIK疗法可有效提高接受化疗治疗的胃癌患者的临床疗效,有效延长生存期[13]。等研究结果也显示DC-CIK可以调节T细胞亚群,提高预后[14]。这提示DC-CIK联合腹腔镜D2根治性全胃切除术具有更好的临床效果,可减少术后的复发率,并具有一定的安全性。

研究认为胃癌的发生和发展与机体免疫功能失调密切相关,肿瘤细胞也存在免疫逃逸机制,使肿瘤免于被机体清除[15]。并且胃癌患者往往存在营养不良的情况,这也会使机体的免疫力下降,不但会影响肿瘤的复发,也会影响预后[16]。CA19-9是较为敏感的胃癌的标志因子,许多研究已经表明CA19-9不但可以反映胃癌的严重程度,还可以对预后进行判断[17]。本次研究结果显示术前三组的T细胞亚群分布无显著差异,术后1个月后均显著改善,术后观察组的$CD3^+$、$CD4^+$以及$CD4^+/CD8^+$显著高于对照组,$CD8^+$显著低于对照组。治疗前两组血清CA 19-9无显著差异($P>0.05$),治疗后均显著降低,治疗后观察组的血清CA 19-9显著低于对照组。这说明DC-CIK方法可显著的提高胃癌患者的免疫能力,并提高预后。SRF是近年来发现的一种参与

肿瘤生长和转移的蛋白,研究表明胃癌组织中的SRF表达水平显著高于癌旁组织,并且SRF可以调节E-cadherin以及β-catenin等的水平调节胃癌细胞的迁移和侵袭过程。本次的研究结果还显示治疗前两组组织SRF蛋白相对表达量无显著差异,治疗后均显著降低,治疗后观察组的组织SRF蛋白相对表达量显著低于对照组。这说明DC-CIK可能通过抑制SRF蛋白水平,降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力,从而减少胃癌的术后复发率,提高预后。

综上所述,腹腔镜辅助D2根治性全胃切除术联合DC-CIK对胃癌具有更好的临床效果,可抑制CA19-9、SRF水平。

参考文献:

[1] KITAMURA K, YAMAGUCHI T, TANIGUCHI H, et al. Analysis of lymph node metastasis in early gastric cancer: rationale of limited surgery[J]. J Surgical Oncology, 2015, 64(1):42-7.

[2] YUANYING Y, LIZHI N, FENG M, et al. Therapeutic outcomes of combining cryotherapy, chemotherapy and DC-CIK immunotherapy in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer[J]. Cryobiology, 2013, 67(2):235-40.

[3] SONG YX, HUANG XZ, GAO P, et al. Clinicopathologic and prognostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in gastric cancer: a meta-analysis[J]. Disease Markers, 2015, 2015(23):1-11.

[4] O'HURLEY G, PRENCIPE M, LUNDON D, et al. The analysis of serum response factor expression in bone and soft tissue prostate cancer metastases[J]. Prostate, 2014, 74(3):306-13.

[5] 所剑. 第5版日本《胃癌治疗指南》更新要点[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(4):402-5.

[6] 龚福生, 陈路川, 杨建伟, 等. 自体肿瘤抗原负载DC-CIK细胞治疗胃癌的疗效分析[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(6):813-8.

[7] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2014, 14(4):408-15.

[8] SANO T, SASAKO M, KINOSHITA T, et al. Recurrence of early gastric cancer. Follow-up of 1475 patients and review of the Japanese literature[J]. Cancer, 2015, 72(11):3174-8.

[9] KIM HH, HAN SU, KIM MC, et al. Long-term results of laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: a large-scale case-control and case-matched Korean multicenter study[J]. J Surgical Oncology, 2014, 32(7):627-33.

[10] 高作文, 郑劼, 娄金书, 等. DC-CIK细胞免疫治疗胃癌的临床疗效及预后分析[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2):174-9.

[11] Li DP, Li W, FENG J, et al. Adjuvant chemotherapy with sequential cytokine-induced killer (CIK) cells in stage IB non-small cell lung cancer[J]. Oncology Research, 2015, 22(2):67-8.

[12] HU J, HU J, LIU X, et al. Effect and safety of cytokine-induced killer (CIK) cell immunotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis[J]. Medicine, 2017, 96(42):1-6.

[13] 孙伟红, 魏晓芳, 赵鹏, 等. 胃癌患者DC-CIK治疗前后外周血Treg细胞及相关细胞因子的变化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(1):79-83.

[14] ZHAO YJ, JIANG N, SONG QK, et al. Continuous DC-CIK infusions restore CD8+ cellular immunity, physical activity and improve clinical efficacy in advanced cancer patients unresponsive to conventional treatments[J]. APJCP, 2015, 16(6):2419-23.

[15] 高俊, 王静东, 王琦三. 含ω-3多不饱和脂肪酸的肠外营养对胃癌病人免疫功能影响的Meta分析[J]. 肠外与肠内营养, 2015, 22(2):107-11.

[16] 鲁力, 谢敏, 魏少忠, 等. 术前与术后早期肠内营养对老年胃癌患者术后免疫功能及营养状态的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(18):1170-3.

[17] 程鹏. 胃癌诊断中肿瘤标志物CEA、CA19-9、CA125的水平变化及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2014, 14(20):5679-81.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第252页)

综上所述,本研究结果表明,黄芩素可能不是通过Smad信号途径影响HSC-T6的活化。黄芩素是否通过非经典途径如MAPK等途径抑制TGF-β表达,达到其抗肝纤维化的作用是我们下一步研究的目标。

参考文献:

[1] MACKINNON AC, GIBBONS MA, FARNWORTH SL, et al. Regulation of transforming growth factor-β1-driven lung fibrosis by galectin-3 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(5):537-46.

[2] HIGASHI T, FRIEDMAN SL, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121: 27-42.

[3] INOUE T, JACKSON EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 378(1):129-35.

[4] RASTOGI R, GENG X, LI F, et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 10:301.

[5] KIENHÖFER D, BOELTZ S, HOFFMANN MH. Reactive oxygen homeostasis-the balance for preventing autoimmunity[J]. Lupus, 2016, 25(8):943-54.

[6] ASK K, BONNIAUD P, MAASS K, et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3):484-95.

[7] LI M, KRISHNAVENI MS, LI C, et al. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. J Clin Investig, 2011, 121(1):277-87.

[8] 张文青, 顾广祥, 夏强. 转化生长因子β和信号转导和转录激活因子3在肝纤维化发生中的相互作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(10):792-6.

[9] FABREGAT I, CABALLERO-DÍAZ D. Transforming growth factor-β-induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. Front Oncol, 2018, 8:357.

(本文编辑:秦旭平)