

文章编号 1006-8147(2015)04-0363-04

综述

肿瘤免疫治疗与化疗的协同效应研究现状

黄纯 综述,李凯 审校

(天津医科大学肿瘤医院肺部肿瘤内科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津300060)

关键词 肿瘤;免疫治疗;化疗

中图分类号 R730.5

文献标志码 A

肿瘤免疫治疗由于其较低的毒性和较高的特异性,长期以来一直被认为是一种很有吸引力的治疗手段^[1],其中肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)是最为理想的免疫效应细胞^[2]。肿瘤免疫治疗主要包括细胞因子、单克隆抗体、肿瘤疫苗^[3]及细胞过继免疫治疗等。实体肿瘤免疫主要通过CTL、自然杀伤细胞(NK)、自然杀伤T细胞(NKT)等介导杀伤效应。树突细胞(DCs)在协调上述细胞的过程中扮演重要角色。而肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、调节性T细胞(Treg)、骨髓来源的抑制性细胞(MDSC)又形成了一个抑制免疫效应的网络,在免疫抑制因素存在时如何有效诱导抗肿瘤T细胞效应一直备受关注。然而,单一CTL免疫治疗在多项临床试验中未能展示其突出的临床疗效^[4]。化疗是恶性肿瘤传统的治疗方法之一,它能够杀死增殖活跃的肿瘤细胞,但化疗通常对免疫系统有抑制作用^[5]。因此,CTL联合化疗这种治疗模式一直被多数学者认为不甚合理。近年来的临床研究表明,免疫治疗联合化疗能够使部分患者临床获益,所以联合治疗这种模式再次受到重视^[6]。然而,二者联用产生协同效应的具体机制仍不甚清楚。

1 化疗对免疫系统的作用

大多数化疗药物能够杀死快速分裂细胞,包括免疫系统中的细胞。强烈的化疗可致淋巴细胞减少及循环T细胞比例下降^[7]。有证据表明,经典化疗方法可降低T细胞功能,最终降低抗肿瘤免疫效应^[7]。Spisek等^[8]的研究表明,蛋白酶体抑制剂硼替佐米可诱导细胞表面的HSP90表达。后者(HSPs)是一个危险信号,对DCs来说意味着向外传递了“吃我”的信息^[9]。但非细胞毒剂量的化疗药物,如紫杉醇、阿霉素、丝裂霉素C和氨甲喋呤等,却以一种IL-12

依赖的自分泌模式增加了肿瘤抗原的递呈^[10]。DCs经长春新碱处理之后历经成熟,其诱导CD8⁺T细胞反应的能力明显增强^[11]。化疗也通过直接影响肿瘤细胞的方式诱导抗肿瘤反应,使得致免疫原性细胞死亡^[12],并可使肿瘤细胞更易被CTL杀伤;有数据显示5-Fu、CPT-11和DDP可以增加结肠癌细胞系SW480被T细胞杀伤的敏感性^[13]。化疗还可去除MDSC和调节性T细胞而消减肿瘤微环境中的免疫抑制因素^[14]。

免疫原性是指能够刺激机体产生特异性抗体或致敏淋巴细胞的能力,化疗药物可通过诸多细胞反应来增强肿瘤细胞的免疫原性。用蒽环类化疗药物处理肿瘤细胞后,细胞内的钙网蛋白可转运到细胞表面来介导免疫反应,促使树突状细胞激发肿瘤特异性的T细胞免疫反应^[15]。化疗药物还可通过调节肿瘤抗原表达的质或量,来改变肿瘤细胞的免疫原性。Ramakrishnan等^[16]通过激光共聚焦显微镜发现化疗药物可以诱导B16F10、U266肿瘤细胞发生自噬。化疗药物不仅可以直接杀死肿瘤细胞,也可以通过诱发自噬导致肿瘤细胞的应激和死亡,而后者更加具有免疫原性继而激发机体免疫反应^[17]。因此,那些处于应激状态并即将死亡的肿瘤细胞可以被看作是一种“治疗性疫苗”来调节机体免疫进而控制残余的肿瘤细胞^[18]。Michaud等^[19]指出,自噬对于化疗诱导的细胞死亡不是必要的,但对于增加免疫原性是必要的。化疗后那些有能力发生自噬的肿瘤能够诱导树突细胞和T细胞进入肿瘤床。

综上,化疗可增加肿瘤抗原的递呈。细胞毒药物能通过调节全身免疫抑制因素或降低某些细胞数量而导致抗原特异性T细胞的扩增。化疗药物可通过多种途径来增强肿瘤细胞的免疫原性。较低的非细胞毒剂量的化疗药物可改善机体免疫功能,但传统剂量的化疗药物是否可以增加免疫治疗效应尚存争议。

基金项目 国家自然科学基金面上资助项目(81372467)

作者简介 黄纯(1973-),男,副主任医师,博士,研究方向:临床肿瘤学;通信作者:李凯,E-mail: yellowpure@126.com。

2 免疫治疗联合化疗是否可产生协同效应

免疫治疗不仅能重建人体免疫系统,保护患者机体平衡不受破坏,还能有效克服化疗耐药等难题。例如,干扰素联合化疗治疗慢性粒细胞白血病可减低化疗药物的剂量。化疗和不同肿瘤疫苗的联合使用可有效提高临床有效率^[20]。胰腺癌患者注射 DC 疫苗后再用吉西他滨进行化疗,可显著降低肿瘤的生长并提高胰腺癌患者的生存率^[21]。用抗 CTLA-4 的单克隆抗体联合化疗治疗小细胞肺癌的 II 期临床试验中,相比单独化疗,联合治疗显示出更好的抗肿瘤效果^[22]。

在前期工作中^[16,23],本研究团队以 B16F10 恶性黑色素瘤小鼠模型作为研究对象,选用从 Pmel-1 转基因小鼠脾脏分离获得的 Pmel T 细胞进行免疫治疗(其可以识别 B16F10 细胞上 gp100 抗原表位),以紫杉醇 12.5 mg/kg(非细胞毒剂量)进行化疗。结果表明,单独给予 T 细胞或紫杉醇虽可抑制肿瘤生长,但停止治疗后 1 周又继续增长;两者联合治疗的抗肿瘤效应显著增强。在第 2 个模型中,我们将表达 Neu 癌基因的 TUBO 乳腺癌细胞接种至 BALB/c 小鼠皮下,以负载 Neu 来源肽的 DC 疫苗进行免疫治疗。同样,单一治疗作用微弱,而 DC 疫苗联合紫杉醇的抗肿瘤效果显著。在第 3 个模型中,笔者将表达鸡 OVA 的 EG-7 淋巴瘤细胞接种至小鼠皮下,使用 OVA 来源的肽(SINFEKL)免疫小鼠,从小鼠脾脏分离纯化获得 T 细胞进行过继性免疫治疗。T 细胞或紫杉醇单独应用均使肿瘤轻微缩小,二者联合显著增强抗肿瘤效应。

3 免疫治疗联合化疗产生协同效应的分子机制

给小鼠注射紫杉醇后,CTL 穿透肿瘤实质的能力增加。这可能归咎于化疗可破坏肿瘤间质细胞。体外实验结果显示,给予非细胞毒剂量的化疗药物可以使肿瘤细胞对 CTL 介导的杀伤作用更加敏感。尽管紫杉醇、阿霉素、顺铂 3 种药物作用机制不甚相同,但它们均可诱导上述现象。

CTL 可通过包括 IFN- γ 、Fas/FasL^[24]以及穿孔素/颗粒酶 B^[25]等机制发挥细胞毒作用。IFN- γ 能杀伤肿瘤细胞,但其在诱导程序性死亡的过程中扮演何种角色尚不得知。在体内肿瘤模型中,NK 和 NKT 细胞能够产生 IFN- γ 对抗肿瘤生长,但只能引发有限的肿瘤细胞死亡。IFN- γ 可促进某些细胞因子如 CXCL10 产生而帮助在肿瘤部位募集免疫细胞,还可与 IL-12 一起通过活性氧簇和氮的中间产物在凋亡过程中发挥作用^[26]。IFN- γ 通过上调 HT29 肿瘤细胞表面 Fas 和 Fas L 而诱导凋亡^[27]。Kiefer 等^[28]认

为 IFN- γ 能够通过直接或是间接的方式诱导凋亡相关基因,调控不依赖 p53 的凋亡途径。在前期研究中,本研究团队试图证实联合治疗效果与 IFN- γ 诱导的凋亡存在相关,但结果显示 IFN- γ 的水平在对照组和治疗组之间没有显著性差异。

Fas 通路是广为人知的诱导凋亡通路,其涉及效应细胞表面上的 FasL 和靶细胞表面上的 Fas 受体(CD95)。FasL 通过三聚作用结合并激活受体。被激活的受体可以募集一些衔接分子,如 Fas 相关的死亡受体蛋白(FADD),从而进一步激活 procaspase 8。Caspase 8 通过 BID 或是细胞色素 C 途径激活 caspase 3,最终导致 DNA 断裂^[29]。本研究团队评估了 3 种药物(紫杉醇、顺铂、阿霉素)治疗后肿瘤细胞表面上 Fas 的表达和脾细胞表面上 FasL 的表达后发现,以上药物均未改变 Fas 或是 FasL 的表达,却显著增加了颗粒酶 B 对靶细胞膜的通透性。所有尝试的细胞毒药物也都增加了人肿瘤细胞系细胞内颗粒酶 B 的水平^[23]。除此之外,抑制颗粒酶 B 的活性降低了紫杉醇对 CTL 诱导的凋亡作用,从而证实了化疗联合 CTL 的协同作用是通过上述关键机制发挥作用的^[23]。

CTL 和 NK 细胞通常利用接触依赖性机制杀伤恶性肿瘤细胞。当效应细胞接触靶细胞之后,CTL 释放穿孔素、穿孔素和丝氨酸蛋白酶的一个家族成员(颗粒酶)^[30-31]。颗粒酶 B 是颗粒酶家族中研究最多也是最重要的成员。颗粒酶 B 既可以诱导 caspase 依赖,也可诱导 caspase 非依赖的细胞死亡。颗粒酶 B 可以间接的通过 BCL-2 家族中的促凋亡成员 BH3 结构域凋亡诱导蛋白(BID)进而引发 caspase 激活^[32-33]。此外,其也可以通过不依赖 BID 的途径诱导细胞凋亡^[34]。

最初人们认为穿孔素扮演一个管道角色,通过将自己插入细胞膜而产生一个通道,使颗粒酶 B 被动地穿过^[35]。但最近的研究表明其并非是靶细胞摄取颗粒酶 B 的唯一机制。有证据显示颗粒酶 B 穿入细胞可以被受体介导的细胞内吞作用控制^[36]。其中介导颗粒酶 B 摄入细胞最主要的受体之一是甘露糖 6 磷酸受体(M6PR)^[37]。人类的 M6PR 基因定位于 6q26,该基因编码的 M6PR 蛋白是单链跨膜受体,在所有的组织细胞中都表达,90%位于细胞内,其余分布在细胞膜。M6PR 可与两种类型的配体结合,一种是胰岛素样生长因子 2(insulin-like growth factor II,IGF-II),另一种是含有 6-磷酸甘露糖基的蛋白质。该受体的基本功能是在细胞内将磷酸甘露糖酰糖蛋白从高尔基体运到溶酶体,以及将包括 IGF-

II 在内的细胞外配体内化并转运至溶酶体中进行降解。在前期体外研究中本研究团队发现紫杉醇、顺铂、阿霉素均可以上调肿瘤细胞表面 M6PR,同时颗粒酶 B 也被更多摄入肿瘤细胞^[16]。因此推断化疗通过上调肿瘤细胞表面 M6PR 增强了 CTL 免疫治疗的效果。应用特异性 M6PR shRNA 下调肿瘤细胞 M6PR 的表达导致经紫杉醇预处理的肿瘤细胞摄取颗粒酶 B 显著下降,表明上调 M6PR 能够使肿瘤细胞对 CTL 的细胞毒作用更加敏感^[16]。笔者使用紫杉醇、阿霉素预处理 CTL 18 h,并测量 CTL 对 EL-4 肿瘤靶细胞的细胞溶解活性。经紫杉醇预处理后,CTL 的特异性细胞毒作用没有增强,阿霉素反而使 CTL 作用减弱。但是,当 CTL 和肿瘤细胞同时经过紫杉醇处理后,细胞毒效应明显增加。这提示化疗不能直接增强 CTL 的细胞毒作用。随后,应用缺乏穿孔素表达的 CTL 来处理肿瘤靶细胞,结果发现这些 CTL 不能杀死未经化疗预处理的靶细胞,但可以有效地杀死经过化疗处理过的肿瘤细胞。以上结果表明,化疗可通过上调肿瘤细胞 M6PR 调节颗粒酶 B 的摄取并降低了细胞毒杀伤过程对穿孔素的需求。

4 结语

恶性肿瘤的免疫治疗联合化疗可以产生协同效应。化疗药物可通过多种途径来增强肿瘤细胞的免疫原性。非细胞毒剂量的化疗可增加肿瘤抗原的递呈,还可下调 MDSC、Treg 等免疫抑制因素进而导致抗原特异性 T 细胞的扩增。目前,免疫治疗与化疗协同效应的分子机制仍有很多盲点。通过前期研究,本研究团队提出了一个新的机制来阐述 CTL 与化疗在肿瘤治疗中的协同作用。在单一免疫治疗中,由肿瘤疫苗诱导产生或是体外诱导培养并输入患者的 CTL 能穿透进入肿瘤实质并接触到表达抗原的肿瘤细胞,CTL 被激活后释放穿孔素和颗粒酶 B 而杀伤肿瘤细胞。因此,免疫治疗的效应由渗透进入肿瘤实质内的 CTL 以及表达特异性抗原的肿瘤细胞的数量共同决定。这个免疫激发的过程还与肿瘤微环境中的诸多免疫抑制细胞相拮抗,单一免疫治疗后通常只能在有限的患者中检测到抗肿瘤免疫反应。化疗可破坏肿瘤基质从而导致更多的 CTL 穿透进入肿瘤实质,也可抑制肿瘤微环境中的负性调控网络进而发挥免疫调节作用。更重要的是,化疗上调了肿瘤细胞表面 M6PR 的表达,随后被激活的 CTL 所释放出来的颗粒酶 B 可以被大量的临近的肿瘤细胞所摄取。因此,相对较少数量的 CTL 可以导致大量肿瘤细胞凋亡。该机制仍需要在动物模型以及肿瘤患者中进一步验证。

参考文献:

- [1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480
- [2] Liao T, Kaufmann A M, Qian X, et al. Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of Cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(1): 159
- [3] Behl D, Porrata L F, Markovic S N, et al. Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia[J]. *Leukemia*, 2005, 23(16, 1, S): 573S
- [4] Schmidt T L, Negrin R S, Contag C H. A killer choice for Cancer immunotherapy[J]. *Immunol Res*, 2014, 58(2/3): 300
- [5] Lake R A, Robinson B W. Immunotherapy and chemotherapy—a practical partnership[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(5): 397
- [6] Ramakrishnan R I, Gabrilovich D I. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(3): 419
- [7] Liseth K, Ersvaer E, Hervig T, et al. Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 692097
- [8] Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, et al. Bortezomib enhances dendritic cell (DC) –mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells:therapeutic implications[J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4839
- [9] Jensen H, Andresen L, Hansen K A, et al. Cell–surface expression of Hsp70 on hematopoietic cancer cells after inhibition of HDAC activity[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(4): 923
- [10] Shurin G V, Tourkova I L, Kaneno R, et al. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12–Dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2009, 183(1): 137
- [11] Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, et al. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17): 6987
- [12] Green D R, Ferguson T, Zitvogel L A. Immunogenic and tolerogenic cell death[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 353
- [13] Bergmann –Leitner E S, Abrams S I. Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti–neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen –specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2001, 50(9): 445
- [14] Butt A Q, Mills K . Immunosuppressive networks and checkpoints controlling antitumor immunity and their blockade in the development of cancer immunotherapeutics and vaccines [J]. *Oncogene*, 2014, 33(38): 4623
- [15] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F A, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death[J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54
- [16] Ramakrishnan R, Huang C, Cho H I, et al. Autophagy induced by conventional chemotherapy mediates tumor cell sensitivity to immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(21): 5483
- [17] Ferguson T A, Choi J, Green D R. Armed response: how dying cells influence T–cell functions[J]. *Immunol Rev*, 2011, 241(SI): 77

- [18] Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(3): 151
- [19] Michaud M, Martins I, Sukkurwala A Q, et al. Autophagy-Dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice[J]. *Science*, 2011, 334(662): 1573
- [20] Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(8): 599
- [21] Ghansah T, Vohra N, Kinney K, et al. Dendritic cell immunotherapy combined with gemcitabine chemotherapy enhances survival in a murine model of pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(6): 1083
- [22] Spigel D R, Socinski M A. Rationale for chemotherapy, immunotherapy, and checkpoint blockade in SCLC: beyond traditional treatment approaches[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(5): 587
- [23] Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1111
- [24] Weigelin B, Krause M, Friedl P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment[J]. *Immunol Lett*, 2011, 138(1): 19
- [25] Heusel J W, Wesselschmidt R L, Shresta S, et al. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells[J]. *Cell*, 1994, 76(6): 977
- [26] Dunn G P, Old L J, Schreiber R D. The three Es of cancer immunoediting[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 329
- [27] Xu X L, Fu X Y, Plate J, et al. IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: Requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(13): 2832
- [28] Ossina N K, Cannas A, Powers V C, et al. Interferon- γ modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(26): 16351
- [29] Kaufmann T, Strasser A, Jost P J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 42
- [30] Voskoboinik I, Dunstone M A, Baran K A, et al. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology[J]. *Immunol Rev*, 2010, 235(1): 35
- [31] Afonina I S, Cullen S P, Martin S J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B[J]. *Immunol Rev*, 2010, 235(1): 105
- [32] Heibein J A, Goping I S, Barry M, et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(10): 1391
- [33] Sutton V R, Davis J E, Cancilla M, et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(10): 1403
- [34] Thomas D A, Scorrano L, Putcha G V, et al. Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(26): 14985
- [35] McCormack R, de Armas L, Shiratsuchi M A. Killing machines: three pore-forming proteins of the immune system[J]. *Immunol Res*, 2013, 57(1/3, SI): 268
- [36] Pinkoski M J, Hobman M, Heibein J A, et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis[J]. *Blood*, 1998, 92(3): 1044
- [37] Motyka B, Korbitt G, Pinkoski M J, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis[J]. *Cell*, 2000, 103(3): 491

(2014-12-17 收稿)

+++++

(上接第 354 页)

品质,使仿制药具有与原创药相同的生物等效性。因此通过国家药品审评部门加大对溶出度试验的审评力度并逐步提高标准,与国际接轨,可促进我国药品生产工艺的提高,推动药品生产企业对制剂工艺的深入研究,带动药学高等教育的发展,同时拉动我国药用辅料行业、制药机械设备等行业的发展和进步,并对药品研发公司的整合、企业兼并的市场行为也必将具有积极的促进作用。

参考文献:

- [1] 卢骏,吴涛,胡建平,等. 格列齐特缓释片的制备及体外释放度[J]. *中国医药工业杂志*, 2004, 35(7): 410
- [2] 谢沐风. 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(3): A23
- [3] 张启明, 谢沐风, 宁保明, 等. 采用多条溶出曲线评价口服固体

制剂的内在质量[J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(2): 308

- [4] 国家食品药品监督管理局标准 YBH03642006 格列齐特缓释片[S]
- [5] Shah V P, Tsong Y, Shathe P, et al. In vitro dissolution profile comparison-statistics of the similarity factor, f_2 [J]. *Pharmaceut Res*, 1998, 15(6): 8891
- [6] 志强, 吴继禹, 张秀华. 用 Excel 软件对溶出数据进行多种曲线拟合和处理[J]. *海峡药学*, 2006, 18(1): 47
- [7] 张莉, 夏运岳. 用电子表格 Excel 计算药物溶出度 Weibull 分布参数[J]. *药学进展*, 2002, 26(1): 8
- [8] 刘瑞新, 李学林, 王青晓. 威布尔溶出曲线的 4 种非线性拟合方法比较[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(15): 1315
- [9] 方积乾. 卫生统计学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 105-105
- [10] 陈健, 朱盛山, 蔡延渠, 等. 口服缓控释制剂数学模型研究概述[J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1625

(2014-11-13 收稿)