

犬肿瘤免疫疗法的研究进展

李巴仑 华进联*

(西北农林科技大学, 动物医学院/陕西省干细胞工程技术中心, 杨凌 712100)

摘要 目前, 犬肿瘤疾病已成为临床常见病。手术疗法、放射疗法及化学疗法作为传统治疗手段虽然在一定程度上能够改善病犬的生存及预后, 但仍不能彻底改变病犬的生存质量。因此, 新的肿瘤治疗方式的引入迫在眉睫。肿瘤免疫疗法的诞生为犬类肿瘤的预防和治疗提供了契机。该文综述了犬肿瘤免疫疗法的研究进展, 包括免疫检查点如程序性死亡受体1(programmed cell death 1, PD-1)/程序性死亡受体配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)及细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4)。同时, 该文评述了过继细胞疗法(adoptive cell therapy, ACT)在犬肿瘤治疗中的前景, 为未来犬肿瘤治疗的研究方向提供了理论基础。

关键词 肿瘤; 免疫疗法; 免疫检查点疗法; 细胞过继疗法; 犬

Research Progress of Canine Tumor Immunotherapy

LI Balun, HUA Jinlian*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, Yangling 712100, China)

Abstract At present, canine tumor diseases have become a common disease in the clinic. Surgical therapy, radiation therapy and chemotherapy as traditional treatments can improve the survival and prognosis of sick animals to a certain extent, however, these strategies still can not revolutionize the survival of sick animals. Therefore, the discovery of new tumor treatment methods is imminent. The birth of tumor immunotherapy provides us an opportunity for the prevention and treatment of canine tumors. Here, the advances in immunotherapy of canine tumors were reviewed in this paper, including the use of three immunological check points, such as PD-1 (programmed cell death 1), PD-L1 (programmed cell death ligand 1), and CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4). Additionally, this paper summarizes the application prospect of adoptive cell therapy, also known as ACT. This review provides a theoretical basis and reference for the future research direction of canine tumor treatment.

Keywords tumor; immunotherapy; immunological checkpoint therapy; adoptive cell therapy; canine

1 肿瘤免疫疗法概述

肿瘤是机体在各种致癌因素作用下, 局部组织细胞在基因水平上发生改变, 导致肿瘤细胞的异常增殖及抑制细胞的凋亡^[1]。目前肿瘤疾病已经成为威胁人类生命安全的重大疾病之一, 对肿瘤的研究

已成为了科学界的热门事件。

传统的肿瘤治疗方法包括手术治疗、化学治疗和放射治疗。近年来, 随着肿瘤免疫疗法的兴起, 尤其是免疫检查点疗法及过继细胞疗法(adoptive cell therapy, ACT)的开发, 为肿瘤治疗提供了新思路, 并

收稿日期: 2019-09-02 接受日期: 2020-03-02

国家自然科学基金(批准号: 23573257)和陕西省重点科技创新团队(批准号: 2019TD-036)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-87080068, E-mail: jinlianhua@nwsuaf.edu.cn

Received: September 2, 2019 Accepted: March 2, 2020

This work was supported by the National Science Foundation of China (Grant No.23573257) and Shaanxi Provincial Significant Technology Innovation Team (Grant No.2019TD-036)

*Corresponding author. Tel: +86-29-87080068, E-mail: jinlianhua@nwsuaf.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5300>

产生了良好的效果。与传统的治疗方法相比, 肿瘤免疫疗法具有靶向性好、疗效持久、副作用小等优点。迄今, 越来越多的研究聚焦于肿瘤免疫治疗的领域。

正常情况下, 免疫系统可以识别并清除肿瘤微环境中的肿瘤细胞。但肿瘤能够采取不同的策略抑制机体免疫系统, 导致免疫系统不能正常地杀伤肿瘤细胞, 从而使肿瘤细胞在抗肿瘤免疫应答的各阶段得以幸存。这种机制称为肿瘤的免疫逃逸^[2-3]。19世纪90年代, COLEY^[4]将术后感染与癌症症状的改善相联系起来, 开创了利用免疫系统控制癌症发展的治疗方法, 但由于放射疗法和化学疗法的快速发展, 且最初的免疫疗法治疗效果不稳定, 免疫疗法很快被研究人员所忽视^[5]。肿瘤免疫治疗是通过各种途径, 重新启动被肿瘤及其微环境抑制的免疫系统, 恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应, 从而控制并清除肿瘤的一种治疗方法。目前, 研究较为完善的两种免疫疗法为免疫检查点疗法及过继细胞疗法。

近年来, 肿瘤免疫检查点CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4)与PD-1 (programmed cell death 1)的发现, 掀起了新一轮的肿瘤免疫疗法热潮。为进一步推进肿瘤免疫疗法的应用, 迫切需要大量的临床前实验动物研究数据以支撑肿瘤免疫疗法的现实可行性。

2 犬肿瘤临床治疗现状

2.1 犬肿瘤治疗概述

犬是最常见的伴侣动物, 伴随着宠物营养及福利的快速发展, 宠物犬寿命逐渐延长。越来越多的肿瘤疾病发生于中老年犬, 给宠物和主人带来了极大的痛苦。常见的犬肿瘤类型包括乳腺肿瘤、皮肤及软组织肿瘤等^[6-8]。目前犬肿瘤的治疗主要依赖于手术、化学治疗及放射疗法, 且在动物诊疗过程中还需进行全身麻醉, 其成本十分昂贵^[9]。恶性肿瘤手术切除后, 常产生肿瘤细胞残留并转移, 且通过间质肿瘤手术无法完全被切除, 化学疗法及放射疗法则会导致免疫细胞麻痹, 从而诱导肿瘤细胞免疫逃避, 并诱导肿瘤细胞突变^[10-12]。因此, 对犬肿瘤治疗的进一步研究迫在眉睫。肿瘤免疫疗法的发展为犬肿瘤治疗带来了希望。

2.2 犬类肿瘤模型的研究优势

在针对肿瘤的研究中, 大多使用相对寿命较短

的小鼠作为动物模型, 并饲养在严格的无特定病原体条件下, 此外普遍认为肿瘤是老龄化及肥胖化的疾病, 因此小鼠作为动物模型无法反映真实的肿瘤发生发展, 无法进行深入的研究^[13]。而犬肿瘤病例则是研究人类肿瘤疾病良好的天然模型^[14]。首先, 犬肿瘤和人类肿瘤在肿瘤定位、转移模式和对治疗的反应方面具有相似性^[7,15]。此外, 宠物犬和人类生活在相似的环境下, 在犬身上发生的肿瘤与人类肿瘤在病因学上具有其他实验动物无可比拟的相似性^[16]。对自发性犬肿瘤病例的研究, 可以为人类肿瘤研究提供大量的临床前研究数据, 推动肿瘤疾病防治研究进展^[17]。

3 经典免疫疗法在犬肿瘤治疗中的应用

现行的免疫疗法主要包括免疫检查点疗法及过继细胞疗法等, 本文综述了以下几种免疫疗法的研究进展。

3.1 免疫检查点疗法

3.1.1 PD-1/PD-L1抗体 1992年, ISHIDA^[18]发现了免疫细胞上的PD-1。1999年, 该课题组通过小鼠实验证明了PD-1具有免疫抑制作用^[19]。1999年, CHEN课题组^[20]在正常细胞和肿瘤细胞中也发现了PD-1, 并取名为B7-H1。2002年, CHEN等^[21]发现肿瘤表面表达的程序性细胞死亡配体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)能够限制免疫细胞, 使肿瘤细胞躲过免疫系统监控。根据这个发现, CHEN等^[21]使用单克隆抗体阻断PD-L1与PD-1的结合, 在小鼠肿瘤模型中取得了很好的治疗效果。SHOSU等^[22]通过流式细胞术及Western blot检测发现, PD-L1在恶性黑色素瘤、乳腺肿瘤、肥大细胞瘤和淋巴瘤中表达较高, 具有PD-L1表达的犬肿瘤类型可作为抗PD-L1治疗的潜在候选者。NEMOTO等^[23]制备了抗犬PD-1及抗犬PD-L1抗体, 并有效阻断了犬PD-1及犬PD-L1的结合。

PD-1是一种由活化的T细胞表达的免疫检查点, 全称为程序性细胞死亡受体1。起初PD-1被认定为是一种在激活的T细胞中诱导细胞死亡的受体^[18], 但如今, 越来越多的证据表明, 其还作为一种免疫检查点在肿瘤抗免疫过程中促进T细胞衰亡。如图1所示, 当肿瘤发生时, 抗肿瘤T细胞逐渐被激活, 肿瘤释放促炎因子如干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ), 使PD-L1激活诱导炎症反应发生, 并与T细胞上的PD-1结合

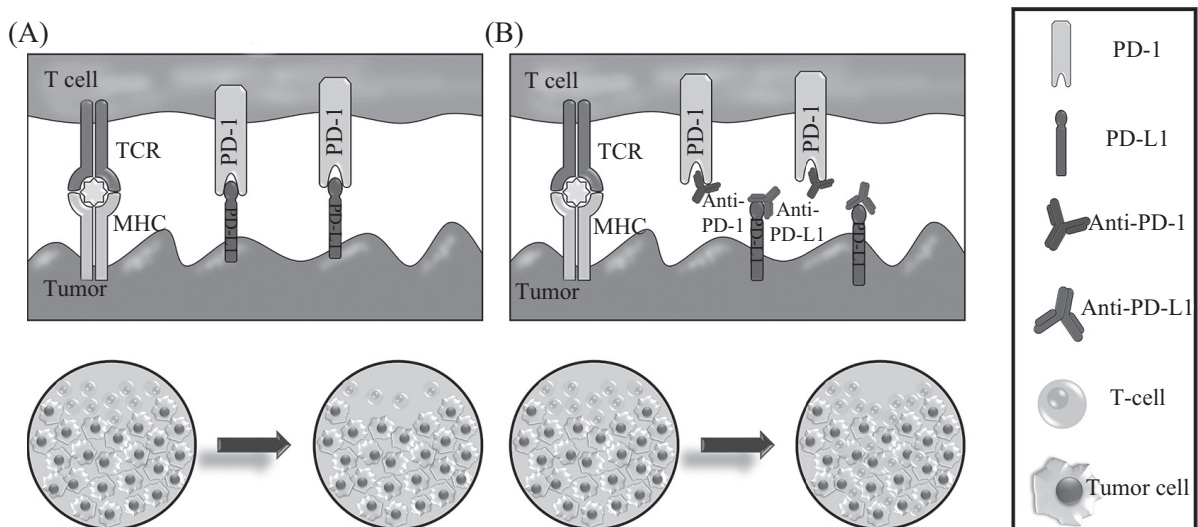
以促进T细胞衰亡^[24]。通过使用针对PD-1/PD-L1的抗体,使PD-1及PD-L1失去结合的能力,从而抵抗肿瘤微环境对T细胞的杀伤作用,促进抗肿瘤T细胞的激活。YIN等^[25]研究表明,PD-1阻断对IL-13R α 2CAR-T细胞疗法治疗犬恶性胶质瘤具有选择性增强作用。使用抗PD-1抗体还可激活体内休眠的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL),从而达到促进细胞免疫的效果^[26]。

3.1.2 CTLA-4抗体 1992年,研究发现CTLA-4可参与共刺激T细胞从而参与免疫疗法^[27]。同年发现CTLA-4在抗原特异性T细胞活化中起关键作用^[28]。从此开始,大量研究集中于CTLA-4。1994年,研究发现CTLA-4可以作为T细胞活化的负调节剂^[29]。1996年,研究人员发现了CTLA-4阻断在抗肿瘤治疗中的促进作用^[30]。最新的研究中,研究人员将CTLA-4与PD-1联合起来,以期达到更好的抗肿瘤治疗效果。

最新研究表明,CTLA-4发挥作用的机制为在细胞外的分子机制^[31]。如图2所示,在健康状态下,调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)表达CTLA-4与CD28,其中CTLA-4以比CD28更高的亲和力结合抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)上表达的CD80和CD86,通过反式内吞作用使CD28不能正常激活T细胞,从而达到免疫调节作用。当在炎症等因素刺激下,APC上调CD80/CD86的表达,以

此摆脱Tregs中CTLA-4对其的控制,使CD28能够与CD86/CD80结合,从而实现T细胞激活增殖。在肿瘤微环境中,Treg上调CTLA-4表达,从而抑制T细胞的激活增殖。抗CTLA-4抗体以高亲和力与CTLA-4结合,使其失去与CD86/CD80结合的能力,从而使CD28发挥作用,使抗肿瘤T细胞大量激活增殖,从而激活抗肿瘤免疫^[24]。HASHEMI等^[32]研究发现,在乳腺肿瘤发生时出现大量Treg聚集。在犬恶性乳腺肿瘤中,同样发现了Treg的大量聚集。CHEN等^[33]研究表明,靶向CTLA-4治疗可通过消耗肿瘤相关Treg从而抑制乳腺肿瘤生长,这意味着,抗CTLA-4抗体可能是治疗犬乳腺肿瘤的一种切实可行的新方法。

3.1.3 两种免疫检查点抗体的联合使用 CTLA-4与PD-1/PD-L1两种免疫检查点分别在不同的部位发挥作用,抑制CTLA-4可促进T细胞的增殖激活,抑制PD-1/PD-L1可促进T细胞对肿瘤的杀伤作用,通过对两种免疫检查点抗体的联合使用,可在多层次多途径上抑制肿瘤对T细胞的抵抗^[34]。抗CTLA-4抗体与抗PD-1抗体联合使用在胃癌的治疗中呈现出积极的作用,其显著抑制了肿瘤细胞的细胞活力^[35]。SRINIVASAN等^[36]在小鼠神经母细胞瘤模型中使用CTLA-4与PD-L1两种抗体具有显著的治疗效果,其中抗CTLA-4抗体能够抑制肿瘤浸润淋巴细胞的扩



A: 当肿瘤细胞与T细胞接触时,肿瘤细胞中PD-L1激活并与T细胞表面的PD-1结合,促进T细胞衰亡,T细胞数量减少。B: 通过使用PD-1/PD-L1抗体,使二者不能结合,从而抵抗肿瘤对T细胞的杀伤作用,T细胞得以进入肿瘤微环境中发挥对肿瘤的杀伤作用。

A: when tumor cells are exposed to T cells, PD-L1 is activated in tumor cells and binds to PD-1 on the surface of T cells, promoting T cell decline, and decreasing the number of T cells. B: PD-1/PD-L1 anti-body prevents the two from binding, thereby resisting the killing effect of the tumor on T cells, and the T cells can enter the tumor microenvironment to exert a killing effect on the tumor.

图1 PD-1/PD-L1及其抗体作用原理

Fig.1 Principle of action of PD-1/PD-L1 and its inhibitors

增, 而抗PD-L1抗体则能够抵抗肿瘤部位的适应性耐药。与使用单一疗法相比, 两者的联合使用具有更广阔的应用前景。

3.2 过继细胞疗法(ACT)

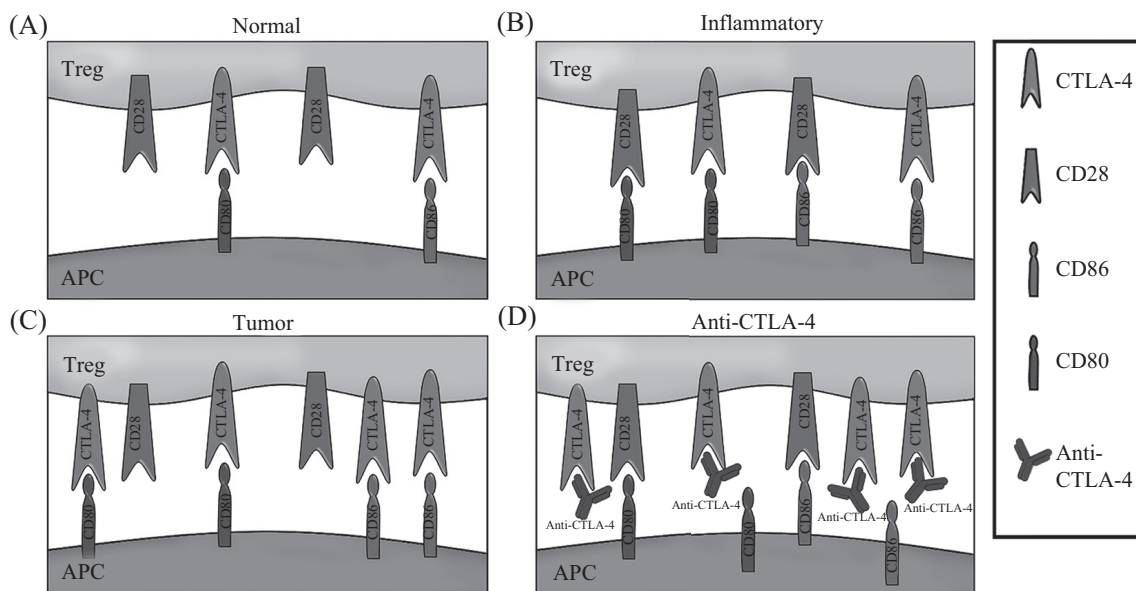
过继细胞疗法指将离体培养扩增的特定细胞群输注回患者体内, 从而达到直接杀伤肿瘤或激发机体的免疫应答杀伤肿瘤细胞的目的。

如图3所示, ACT回输的细胞包括树突状细胞(dendritic cell, DC)、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、具有抗肿瘤反应性的天然宿主细胞如肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL), 以及使用基因工程改造的T细胞, 如使用嵌合抗原受体改造的T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)及T细胞受体基因工程改造的T细胞(T cell receptor-gene engineered T cell, TCR-T), 此外还包括干细胞技术在肿瘤治疗中的积极应用。与其他形式的癌症免疫疗法相对比, ACT具有一定优势。有别于其他的免疫疗法, ACT是一种“活的”治疗方式, 其发挥作用的方式依赖于ACT回输的功能细胞在体内对肿瘤细胞的高效识别能力以及介导肿瘤消退的功能^[37]。

3.2.1 DC免疫治疗 DC以形状命名, 是一个异质性群体, 主要从骨髓、血液中分离得到, 被认为是最有效的抗原呈递细胞, 能够有效激活T细胞^[38]。

DC疗法是将患者自身的单核细胞提取出来, 在体外扩增诱导生成DC, 让DC负载相应的肿瘤抗原后回输到患者体内, 通过分泌IL-12、I型IFN、反式呈递IL-15及分泌外泌体^[39], 使机体重建免疫监视功能, 随血液在全身各处主动搜索识别肿瘤细胞, 诱导产生大量效应T细胞并促使其迁移至肿瘤部位, 辅助T细胞分泌多种细胞因子, 协同T细胞杀死肿瘤细胞。DE SILVA等^[38]研究表明, 在自发性犬非上皮性恶性肿瘤及自发性肾细胞癌中皮下注射DC显著增强了抗肿瘤免疫的效果, 且通过将DC与合成脂肽h11c联合使用, 可极大促进DC的激活。RAMOS-ZAYAS等^[40]研究表明, 在犬传染性性病肿瘤(canine transmissible venereal tumour, CTVT)中使用CTVT细胞裂解液处理后的DC可显著促进肿瘤消退。研究表明, DC疫苗可延长自发性犬血管肉瘤病例的中位存活期, 并在部分病例中获得长期幸存者^[41]。

3.2.2 NK细胞免疫疗法 1975年, 首次鉴定发现



A: 健康状态下, Treg与APC结合, Treg表面的CTLA-4以高于CD28的亲合力与CD80/CD86结合, 抑制T细胞的增殖。B: 炎症发生时, APC上调CD80/CD86的表达, 使CD28能够结合CD80/CD86, 从而促进T细胞增殖。C: 肿瘤微环境中, Treg高度表达CTLA-4, 以抑制CD28的功能, 从而抑制T细胞的激活增殖。D: CTLA-4抗体使CTLA-4不能结合CD80/CD86, 从而恢复CD28与CD80/CD86的结合, 抗肿瘤T细胞增殖并发挥作用。
A: in a healthy state, Treg binds to APC, and CTLA-4 on the surface of Treg binds to CD80/CD86 with an affinity higher than CD28, and inhibits proliferation of T cells. B: at the time of inflammation, APC up-regulates the expression of CD80/CD86, enabling CD28 to bind to CD80/CD86, thereby promoting T cell proliferation. C: in the tumor microenvironment, Treg highly expresses CTLA-4 to inhibit the function of CD28, thereby inhibiting the activation and proliferation of T cells. D: the CTLA-4 antibody prevents CTLA-4 from binding to CD80/CD86, thereby restoring the binding of CD28 to CD80/CD86, and anti-tumor T cell proliferation and function.

图2 CTLA-4抗体作用原理

Fig.2 Principle of action of CTLA-4 and its inhibitors

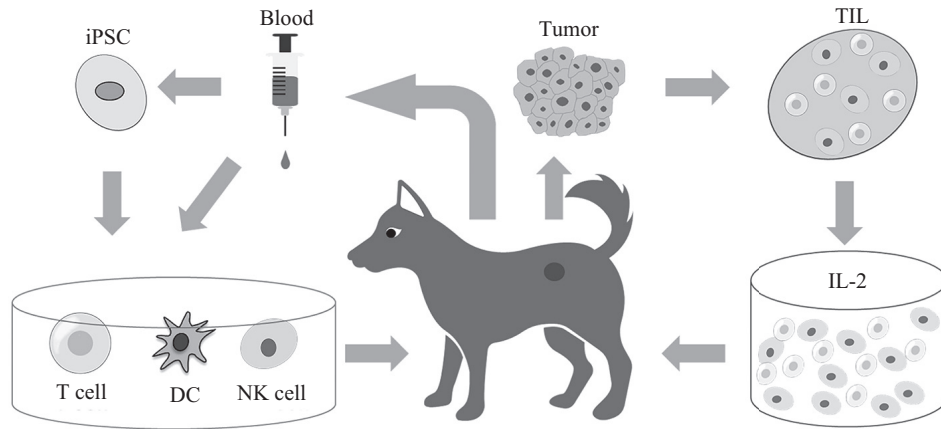


图3 过继细胞疗法

Fig.3 Adoptive cell therapy

NK细胞为一类与T细胞和B细胞不同的细胞。此后,越来越多的研究人员发现其可以作为肿瘤的细胞疗法^[39]。

NK细胞是先天性淋巴细胞,对肿瘤细胞具有细胞毒性,并通过释放细胞因子和趋化因子来协调免疫应答^[42]。其在骨髓中发育,占外周循环中总淋巴细胞的5%~10%^[43]。NK细胞在骨髓发育的第三阶段中发挥作用,分化形成未成熟NK细胞,在干扰素 β 的产生中发挥作用,以此参与免疫调节。对于NK细胞,常用的鉴定方法为检测CD56的表达及T细胞抗原(如CD3和TCR)的缺乏并以此与T细胞分离^[44]。

NK细胞可通过直接或间接方式杀死肿瘤细胞^[45]。直接方式基于肿瘤细胞和NK细胞之间免疫突触的形成,以此NK细胞发挥对肿瘤细胞的细胞毒性。间接方式通过修饰先天性和适应性免疫应答以获得细胞毒性。与T细胞或其他适应性免疫细胞相反,NK细胞可快速释放炎性细胞因子并在没有预免疫的情况下发挥杀伤细胞的作用。基于NK细胞的肿瘤治疗主要涉及细胞因子、抗体和基于NK细胞的过继疗法。通过改善NK细胞的持久性、活化性、数量或针对肿瘤的特异性靶向性以加强NK细胞对肿瘤的杀伤能力^[46]。ROMANSKI等^[47]将嵌合抗原受体导入NK细胞,逆转了B细胞毒性肿瘤细胞对NK细胞的耐受性,从而加强了NK细胞对肿瘤的杀伤能力。CANTER等^[48]研究表明,自体NK细胞移植可对犬骨肉瘤产生强大的细胞毒性。FELICES等^[49]研究表明,在小鼠卵巢癌模型中NK细胞可以直接裂解肿瘤细胞,加入IL15超激动剂ALT-803能够增强NK细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。BROOKS等^[50]研究表

明,在小鼠胰腺导管腺癌模型中使用NK细胞联合吉西他滨(gemcitabine, 嘧啶类抗肿瘤药物嘧啶类抗肿瘤药物,常用于晚期胰腺癌)的联合疗法可降低手术切除肿瘤后肿瘤的转移和复发。使用嵌合抗原受体技术改造NK细胞也逐渐引起了科学家的兴趣,研究表明CAR-NK细胞表现出惊人的抗肿瘤效果,且具有较CAR-T易于生产的优势^[51]。

3.2.3 TIL免疫疗法 TIL指的是从肿瘤组织中分离出的浸润淋巴细胞群,包括T细胞以及NK细胞等,多数为CD3⁺、CD8⁺ T细胞。TIL疗法是指从肿瘤附近组织中分离出的TIL细胞,加入IL-2进行体外扩增,再回输到患者体内,从而扩大免疫应答,治疗原发性或继发性肿瘤。

TIL的作用机制是通过释放细胞毒素直接杀伤肿瘤细胞,此外还能够调节机体免疫功能,提高机体对肿瘤的杀伤能力。已有大量研究针对TIL治疗恶性黑色素瘤、子宫内膜癌、结肠癌等疾病,通过使用TIL以降低患者全身复发的概率。

已有研究表明,抗肿瘤免疫激活时,部分休眠的TIL也将额外被激活从而达到多重抗肿瘤效果^[26]。RAKAEE等^[52]研究表明,TIL水平与非小细胞肺癌存活率呈正相关。目前,用过继移植的TIL治疗转移性黑色素瘤患者已经发展成为一种有效的治疗方法。相较于几种免疫检查点抗体,在晚期转移性黑色素瘤治疗中TIL具有更好的治疗效果及更低的成本,尚待出现更多的临床数据以支撑TIL疗法走向犬肿瘤临床治疗^[53]。

3.2.4 TCR-T疗法 TCR-T疗法是将患者体内的普通T细胞分离出来,利用基因工程引入新的基因,使

转基因T细胞表达出能够识别肿瘤细胞的T细胞受体, 回输到机体体内从而杀死肿瘤细胞。TCR是T细胞表面的特异性受体, 与CD3结合形成复合物, 再通过识别结合MHC呈递的抗原从而激活T细胞, 促进T细胞的分裂与分化。ORLANDO等^[54]研究表明, PRAME特异性TCR-T可对成神经管细胞瘤模型小鼠起到显著的治疗作用。研究表明, 特异性替换T细胞中的TCR可增强T细胞对血液恶性肿瘤的识别, 基因编辑技术与TCR-T技术的结合将极大拓宽肿瘤免疫疗法的前景^[55]。

3.2.5 CAR-T疗法 CAR-T疗法的原理与TCR-T相似, 通过基因工程将单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)中的抗原识别部分Fab“融合”到T淋巴细胞膜中, 使得细胞毒性T淋巴细胞识别特定靶标并在与癌细胞结合后被激活, 从而杀死肿瘤细胞^[56]。CAR-T疗法以非MHC限制性的方式识别肿瘤细胞并使肿瘤细胞死亡。

一般的细胞过继疗法回输的免疫细胞缺乏肿瘤抗原特异性, 在临床上无法达到期望的治疗效果, 而CAR-T疗法是一种特异性细胞免疫疗法, 通过结合嵌合抗原, 能够特异性地与肿瘤细胞相结合, 有着其他细胞疗法无法比拟的杀伤力, 所以CAR-T疗法将是未来ACT疗法的发展方向。目前绝大多数CAR-T疗法基于DNA, 然而近年来基于RNA的CAR-T疗法也有所增加, 基于RNA的CAR-T疗法主要优势包括使用方便及副作用小, 但同时也存在过敏反应的风险^[57]。研究表明, 在使用CAR-T疗法前先进行体内淋巴细胞清除可极大促进CAR-T在体内的细胞活性和竞争力^[58]。PANJWANI等^[59]设计了靶向CD20的CAR-T细胞, 证实了慢病毒载体可用于制备CAR-T细胞, 并在犬弥漫性大B细胞淋巴瘤中取得了治疗效果。YIN等^[25]研究使用神经胶质瘤细胞系产生犬恶性胶质瘤, 通过使用嵌合IL-13受体 $\alpha 2$ 的CAR-T疗法证实, 犬IL-13受体 $\alpha 2$ CAR-T细胞能够明显抑制犬恶性胶质瘤生长。目前已开展使用于临床的CAR-T疗法主要为CD19 CAR-T, 该疗法在临床使用中显示出高效的抗肿瘤能力^[60]。TCHOU等^[61]研究表明, 在肿瘤内注射RNA CAR-T细胞显示肿瘤部位广泛坏死。SAKAI等^[62]研究表明, cCD20-CAR-T细胞对犬淋巴瘤细胞系在体外具有选择性毒性, 此外, 经过冷冻保存后的cCD20-CAR-T仍具有相似的功能。PANJWANI等^[63]将自体cCD20-CAR-T细胞用于患有

复发性B细胞淋巴瘤犬只, 治疗效果良好, 并产生了短期的抗肿瘤活性。CAR-T疗法也存在一定缺陷。在实质瘤中, CAR-T无法渗透到肿瘤组织中, 其仅能用于转移至腹膜腔的肿瘤, 这是其目前面临的主要困难之一^[57]。

3.2.6 诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)移植 由自体移植的DC、NK细胞及T细胞已经取得了良好的研究成果, 但其也具有明显的局限性, 阻碍了它们的进一步发展及更广泛的应用。自体原代细胞的免疫疗法受制于其制备难度及处理时间, 短期内难以应用到实际临床, 且自体细胞分离扩增的质量和功​​能不均也可能成为ACT疗法产业化的重要障碍^[64]。iPSCs技术则有效弥补了ACT疗法的这些短板。iPSCs具有类似胚胎干细胞的特性, 能在体外无限扩增培养, 并可以成功分化为T细胞及NK细胞等免疫细胞, 可有效解决ACT疗法中细胞质量及数量的难点^[65]。另外, iPSCs可以较易在体外进行基因编辑, 可以对其进行遗传修饰以增强其适用性、效力和持久性。虽然在原代细胞中进行多重基因编辑的潜力有限, 但iPSCs理论上可以承受无限的遗传变化^[66]。最后, 与原代细胞相比, iPSCs的基因工程可产生完全修饰的克隆系, 可对其进行广泛评估, 从而获得稳定安全的来源^[64]。已有研究证明, 由iPSCs诱导而成的抗肿瘤T细胞具有与原代T细胞相同的抗肿瘤反应性及相同的TCR。有趣的是, 从iPSCs中分化诱导NK细胞已被证实比诱导为抗肿瘤T细胞更加简单^[66]。目前使用iPSCs定向诱导以获得抗肿瘤免疫细胞仍存在一些挑战, 首先在iPSCs的诱导中涉及多个步骤的分化过程, 在分化中的效率问题尚未得到有效控制。其次在iPSCs的诱导分化过程中使用的主要为异源血清及饲养细胞, 其安全性尚未得到有效证实^[66]。

4 展望

尽管肿瘤免疫疗法目前已有大量研究基础, 但将免疫疗法应用于犬肿瘤治疗中, 还有许多问题尚待解决。(1)迫切需要对现有靶点的重新筛选、验证, 以达到良好的治疗效果。(2)犬品种繁多, 各品种间体型差异巨大, 免疫疗法的剂量问题难以得到解决, 还需更多的实验数据进行探索。(3)高昂的价格是免疫疗法在犬肿瘤治疗中非常关键的问题, 现行的免疫疗法大多需要一对一的精准治疗, 在治疗中

对宠物医院的技术和条件要求高,且药物价格昂贵。所以免疫疗法在犬肿瘤治疗中的应用还有很长的距离。未来在犬肿瘤免疫疗法的探索中,主要的探索方向应包括以下几点:(1)通过技术优化,以达到降低费用及简化步骤的目的,使免疫疗法的应用更具可行性;(2)研究更广泛的免疫检查点并与细胞免疫疗法相结合,以达到对肿瘤细胞更强大的杀伤作用。毋庸置疑的是,免疫疗法作为目前针对肿瘤靶向性最强、治疗效果最明确的治疗手段,必将是犬肿瘤治疗的曙光和希望。

参考文献 (References)

- [1] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [2] MCCUSKER C, WARRINGTON R. Primary immunodeficiency [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2011, 7 Suppl 1(11): S11.
- [3] VAN PARIJS L, ABBAS A K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off [J]. *Science*, 1998, 280(5361): 243-8.
- [4] COLEY W B. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysipelas and the bacillus prodigiosus) [J]. *Proc R Soc Med*, 1910, 3(Surg Sect): 1-48.
- [5] SHARMA P, HU-LIESKOVAN S, WARGO J A, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-23.
- [6] MACEWEN E G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1990, 9(2): 125-36.
- [7] VILHENA H, FIGUEIRA A C, SCHMITT F, et al. Canine and feline spontaneous mammary tumours as models of human breast cancer [M]. Cham: Springer International Publishing, 2020.
- [8] KOK M K, CHAMBERS J K, TSUBOI M, et al. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008-2017 [J]. *J Vet Med Sci*, 2019, 81(8): 1133-43.
- [9] NOVOSAD C A. Principles of treatment for mammary gland tumors [J]. *Clin Tech Small Anim Pract*, 2003, 18(2): 107-9.
- [10] SIMON D, KNEBEL J W, BAUMGARTNER W, et al. *In vitro* efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors obtained from dogs [J]. *Am J Vet Res*, 2001, 62(11): 1825-30.
- [11] SORENMO K U, HARWOOD L P, KING L G, et al. Case-control study to evaluate risk factors for the development of sepsis (neutropenia and fever) in dogs receiving chemotherapy [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2010, 236(6): 650-6.
- [12] SIMON D, SCHOENROCK D, BAUMGARTNER W, et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel [J]. *J Vet Intern Med*, 2006, 20(5): 1184-90.
- [13] MURPHY W J. Being "penny-wise but pound foolish" in cancer immunotherapy research: the urgent need for mouse cancer models to reflect human modifying factors [J]. *J Immunother Cancer*, 2016, 4(1): 88.
- [14] BARUTELLO G, ROLIH V, ARIGONI M, et al. Strengths and weaknesses of pre-clinical models for human melanoma treatment: dawn of dogs' revolution for immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 799.
- [15] GORDON I, PAOLONI M, MAZCKO C, et al. The comparative oncology trials consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway [J]. *PLoS Med*, 2009, 6(10): e1000161.
- [16] TARONE L, BARUTELLO G, IUSSICH S, et al. Naturally occurring cancers in pet dogs as pre-clinical models for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(11): 1839-53.
- [17] DOW S. A role for dogs in advancing cancer immunotherapy research [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2935.
- [18] ISHIDA Y, AGATA Y, SHIBAHARA K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. *EMBO J*, 1992, 11(11): 3887-95.
- [19] NISHIMURA H, NOSE M, HIAI H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor [J]. *Immunity*, 1999, 11(2): 141-51.
- [20] DONG H, ZHU G, TAMADA K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. *Nat Med*, 1999, 5(12): 1365-9.
- [21] DONG H, STROME S E, SALOMAO D R, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 793-800.
- [22] SHOSU K, SAKURAI M, INOUE K, et al. Programmed cell death ligand 1 expression in canine cancer [J]. *In Vivo*, 2016, 30(3): 195-204.
- [23] NEMOTO Y, SHOSU K, OKUDA M, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2018, 198: 19-25.
- [24] RIBAS A, WOLCHOK J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1350-5.
- [25] YIN Y, BOESTEANU A C, BINDER Z A, et al. Checkpoint blockade reverses anergy in IL-13R α 2 humanized scFv-based CAR T cells to treat murine and canine gliomas [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2018, 11: 20-38.
- [26] GETTINGER S N, CHOI J, MANI N, et al. A dormant TIL phenotype defines non-small cell lung carcinomas sensitive to immune checkpoint blockers [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3196.
- [27] SCHWARTZ R H. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy [J]. *Cell*, 1992, 71(7): 1065-8.
- [28] LENSCHOW D J, ZENG Y, THISTLETHWAITE J R, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig [J]. *Science*, 1992, 257(5071): 789-92.
- [29] WALUNAS T L, LENSCHOW D J, BAKKER C Y, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation [J]. *Immunity*, 1994, 1(5): 405-13.
- [30] LEACH D R, KRUMMEL M F, ALLISON J P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade [J]. *Science*, 1996, 271(5256): 1734-6.
- [31] ROWSHANRAVAN B, HALLIDAY N, SANSOM D M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy [J]. *Blood*, 2018, 131(1):

- 58-67.
- [32] HASHEMI V, MALEKI L A, ESMAILY M, et al. Regulatory T cells in breast cancer as a potent anti-cancer therapeutic target [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106087.
- [33] CHEN H, LUAN X, PAHOLAK H J, et al. Depleting tumor-associated Tregs via nanoparticle-mediated hyperthermia to enhance anti-CTLA-4 immunotherapy [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2020, 15(1): 77-92.
- [34] SPRANGER S, KOBLISH H K, HORTON B, et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment [J]. *J Immunother Cancer*, 2014, 2: 3.
- [35] WANG B, QIN L, REN M, et al. Effects of combination of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 on gastric cancer cells proliferation, apoptosis and metastasis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 260-70.
- [36] SRINIVASAN P, WU X, BASU M, et al. PD-L1 checkpoint inhibition and anti-CTLA-4 whole tumor cell vaccination counter adaptive immune resistance: A mouse neuroblastoma model that mimics human disease [J]. *PLoS Med*, 2018, 15(1): e1002497.
- [37] ROSENBERG S A, RESTIFO N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2015, 348(6230): 62-8.
- [38] DE SILVA N H, AKAZAWA T, WIJEWARDANA V, et al. Development of effective tumor immunotherapy using a novel dendritic cell-targeting Toll-like receptor ligand [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188738.
- [39] AKAZAWA T, SHINGAI M, SASAI M, et al. Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(18): 3334-40.
- [40] RAMOS-ZAYAS Y, FRANCO-MOLINA M A, HERNADEZ-GRANADOS A J, et al. Immunotherapy for the treatment of canine transmissible venereal tumor based in dendritic cells pulsed with tumoral exosomes [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2019, 41(1): 48-54.
- [41] KONDURI V, HALPERT M M, BAIG Y C, et al. Dendritic cell vaccination plus low-dose doxorubicin for the treatment of spontaneous canine hemangiosarcoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(9/10): 282-91.
- [42] VIVIER E, RAULET D H, MORETTA A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells [J]. *Science*, 2011, 331(6013): 44-9.
- [43] JEWETT A, KOS J, FONG Y, et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 178-88.
- [44] ADDISSIE S, KLINGEMANN H. Cellular immunotherapy of canine cancer [J]. *Vet Sci*, 2018, 5(4): 100.
- [45] CHESTER C, FRITSCH K, KOHRT H E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 601.
- [46] FANG F, XIAO W, TIAN Z. NK cell-based immunotherapy for cancer [J]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 37-54.
- [47] ROMANSKI A, UHEREK C, BUG G, et al. CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1287-94.
- [48] CANTER R J, GROSSENBACHER S K, FOLTZ J A, et al. Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial [J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 98.
- [49] FELICES M, CHU S, KODAL B, et al. IL-15 super-agonist (ALT-803) enhances natural killer (NK) cell function against ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(3): 453-61.
- [50] BROOKS J, FLEISCHMANN-MUNDT B, WOLLER N, et al. Perioperative, spatiotemporally coordinated activation of T and NK cells prevents recurrence of pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(2): 475-88.
- [51] LIU E, TONG Y, DOTTI G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity [J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 520-31.
- [52] RAKAEE M, KILVAER T K, DALEN S M, et al. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes using routine H&E slides predicts patient survival in resected non-small cell lung cancer [J]. *Hum Pathol*, 2018, 79: 188-98.
- [53] RETEL V P, STEUTEN L M G, GEUKES FOPPEN M H, et al. Early cost-effectiveness of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) for second line treatment in advanced melanoma: a model-based economic evaluation [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 895.
- [54] ORLANDO D, MIELE E, DE ANGELIS B, et al. Adoptive immunotherapy using prame-specific T cells in medulloblastoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3337-49.
- [55] LEGUT M, DOLTON G, MIAN A A, et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells [J]. *Blood*, 2018, 131(3): 311-22.
- [56] OKUR F V, BRENNER M K. Cellular immunotherapy of cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 651: 319-45.
- [57] XU X, QIU J, SUN Y. The basics of CAR T design and challenges in immunotherapy of solid tumors-ovarian cancer as a model [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(7): 1548-55.
- [58] DESELM C J, TANO Z E, VARGHESE A M, et al. CAR T-cell therapy for pancreatic cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2017, 116(1): 63-74.
- [59] PANJWANI M K, ATHERTON M J, MALONEYHUSS M A, et al. Establishing a model system for evaluating CAR T cell therapy using dogs with spontaneous diffuse large B cell lymphoma [J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1676615.
- [60] GOMES-SILVA D, RAMOS C A. Cancer immunotherapy using CAR-T cells: from the research bench to the assembly line [J]. *Biotechnol J*, 2018, doi: 10.1002/biot.201700097.
- [61] TCHOU J, ZHAO Y, LEVINE B L, et al. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(12): 1152-61.
- [62] SAKAI O, IGASE M, MIZUNO T. Optimization of canine CD20 chimeric antigen receptor T cell manufacturing and in vitro cytotoxic activity against B-cell lymphoma [J]. *Veterinary and comparative oncology*, 2020, doi:10.1111/vco.12602
- [63] PANJWANI M K, SMITH J B, SCHUTSKY K, et al. Feasibility and safety of RNA-transfected CD20-specific chimeric antigen receptor T cells in dogs with spontaneous B cell lymphoma [J].

- Mol Ther, 2016, 24(9): 1602-14.
- [64] HANDGRETINGER R, LANG P, ANDRE M C. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia [J]. Blood, 2016, 127(26): 3341-9.
- [65] KENNEDY M, AWONG G, STURGEON C M, et al. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures [J]. Cell Rep, 2012, 2(6): 1722-35.
- [66] NIANIAS A, THEMELI M. Induced pluripotent stem cell (ipsc)-derived lymphocytes for adoptive cell immunotherapy: recent advances and challenges [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2019, 14(4): 261-8.