

## 肿瘤的过继性细胞免疫治疗

陶加献

张永康

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

(上海医科大学附属中山医院 200032)

目前开展 LAK、TIL 细胞治疗恶性肿瘤临床研究的单位甚多。本文比较全面地综述了 LAK 和 TIL 细胞的来源、特性、体外激活和扩增以及一些效应的可能机理与临床应用概况等资料, 仅供读者参考。

—编者—

人体免疫系统对肿瘤的认识、杀伤或清除主要通过以下四条途径: 一是抗体通过补体产生的溶细胞作用。在肿瘤的刺激下, B 淋巴细胞有可能产生一些抗体。它们能识别并与肿瘤细胞表面的某些抗原分子结合, 之后, 由于抗体上补体结合位点被暴露, 补体系统被激活并对肿瘤细胞膜产生破坏作用。二是依赖抗体的细胞毒细胞对肿瘤细胞的杀伤。这是因为有些细胞毒细胞如巨噬细胞、NK 细胞表面具有抗体的 Fc 段的受体。结合在肿瘤细胞上的抗体与 Fc 受体结合后, 使细胞毒细胞和肿瘤细胞发生交联, 从而引起细胞毒细胞对肿瘤细胞的杀伤。三是非特异性细胞毒细胞对肿瘤细胞的直接杀伤。这些细胞和肿瘤细胞结合后释放出一些细胞因子和介质, 破坏肿瘤细胞膜或裂解肿瘤细胞的 DNA, 达到杀伤肿瘤细胞作用。但其细胞间相互结合的机理尚不清楚, 可能与某些粘附分子有关。四是特异性细胞毒 T 细胞的杀伤作用。细胞毒 T 细胞上的特异性抗原受体能够识别结合在自身主要组织相容性复合体 (MHC) 分子上的肿瘤抗原。因此, 这些细胞往往只能识别和杀伤自体的某一种肿瘤, 而对于异体的肿瘤不表现为杀伤活性。这主要是因为 MHC 分子的约束性的缘故。上述的四种途径中, 前两者都涉及到抗体的参与。然而, 在某些情况下, 抗体有可能对肿瘤细胞产生封闭作用而引起促进细胞生长的作用, 即所谓免疫

增强作用。后两者则主要由效应细胞介导, 属细胞免疫范畴。

虽然人体具有上述复杂而有效的免疫系统来抗御肿瘤的发生、发展, 但事实上大多数的恶性肿瘤具有不可扼制的生长和转移的趋势, 直到病人的死亡。很明显这提示肿瘤逃脱了免疫系统的监视, 但其机理还不十分清楚。其中一个重要原因是肿瘤发展过程中, 产生一些抑制因子抑制了免疫系统的功能。Darrow 等<sup>[1]</sup>在体外实验中发现照射过的肿瘤细胞与淋巴细胞一起培养时, 淋巴细胞的功能受到抑制。甚至肿瘤细胞的培养上清也能抑制淋巴细胞对 IL-2 刺激的增殖反应。他们发现这种抑制是可逆的。淋巴细胞经过洗涤后恢复对 IL-2 刺激的应答能力。

在体内, 肿瘤细胞浸润的淋巴结细胞在淋巴因子诱导下的细胞毒活性明显降低, 在其培养上清中发现一种可溶性的抑制性因子。它的含量在肿瘤引流的近程淋巴结中明显高于远程的淋巴结<sup>[2]</sup>。从病毒转染的成纤维细胞瘤培养上清中发现一种分子量在 15kD—25 kD 之间的蛋白质, 它能抑制 PHA、ConA 或 LPS 诱发的人或小鼠淋巴细胞的增殖<sup>[2]</sup>。经过多种处理如酸碱处理、加热至 56℃ 或 100℃、及反复冻融后, 均能使其丧失活性。抗 TGF- $\beta$  的单抗能阻断它的抑制作用, 但还不清楚这种蛋白是 TGF- $\beta$  本身, 还是它的效应依赖于 TGF- $\beta$  的

参与。另一项研究发现肿瘤细胞培养上清中的抑制性因子对 CD 4<sup>+</sup>T 细胞的作用不明显,而主要抑制 CD 8<sup>+</sup>T 细胞的细胞毒活性,而且知道它不是 TGF- $\beta$ [<sup>9</sup>]。如前所述,肿瘤细胞分泌的抑制性因子可能不是单一的,不同的肿瘤细胞产生的抑制性因子有可能不一样。

肿瘤的免疫治疗,在 70 年代,主要开展应用卡介苗、短小棒状杆菌等激发机体的非特异免疫应答水平,以摆脱肿瘤病人体内免疫应答受抑制的状态,提高机体抗肿瘤的能力。但在实际的治疗中只有个别病例出现一定的疗效,大量病例的统计结果没有表明具有明显的意义。近 10 多年来,从细胞免疫的角度出发,应用多种细胞因子来激活淋巴细胞,使它们具有杀伤肿瘤细胞的能力,然后将它们回输到病人体内杀伤肿瘤细胞。这就是肿瘤的过继性免疫治疗。

已有不少学者应用这一疗法在小鼠肿瘤模型上取得成功。给小鼠输入用白细胞介素-2 (IL-2) 激活的淋巴细胞能有效地抑制转移灶和原发灶肿瘤的生长,甚至使病灶消退。重组 DNA 技术的应用使 IL-2 的生产能够满足临床治疗的需要。从 80 年代初开始以来,过继性免疫治疗已用于临床,并取得了令人鼓舞的效果。

就用于该治疗的细胞来源,主要分为淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)两种。现分别将有关进展简述于下。

## 一、LAK 细胞

### 1. LAK 细胞的特点

从病人或正常人外周血分离得到的经过体外淋巴因子激活的具有细胞毒活性的免疫活性细胞称为 LAK 细胞(Lymphokine activated killer cell)。用于激活细胞的淋巴因子主要指 IL-2。LAK 细胞对肿瘤细胞的杀伤具有非抗原特异和非 MHC 约束的特征。在体外实验中,它能对多种来源的肿瘤细胞进行杀伤,包括对自体 and 异体的肿瘤细胞以及对 NK 细胞不敏感的

Daudi 细胞。

LAK 细胞的前体细胞还不完全清楚。分析建株的 LAK 细胞克隆发现有些克隆的 T 细胞抗原受体  $\beta$  链基因发生了重排,提示这部分克隆的前体细胞是 T 细胞系来源。有些克隆的  $\beta$  链和  $\gamma$  链基因都处于胚系状态,说明它们是非 T 细胞来源[<sup>4</sup>],有可能是 NK 细胞来源的[<sup>5</sup>]。如果说有部分 LAK 细胞是来源于 NK 细胞,那么它们的某些生物学特征已不同于 NK 细胞本身。所以,从 LAK 细胞来源角度来看,它们很可能是具有相似细胞毒活性的混合的细胞群体,甚至 B 淋巴细胞和“裸细胞”(null cell)在适当的培养条件下,也可表达 LAK 活性[<sup>6</sup>]。因而,LAK 细胞的表面标志也是多样的,如表 1,而且这种表型在不同的培养系统中可能出现不同的结果。

表 1 非 MHC 约束性细胞毒细胞的表型[<sup>5</sup>]

细胞分型	百分比
CD 3 <sup>-</sup> CD 56 <sup>+</sup> CD 16 <sup>+</sup>	90
CD 3 <sup>-</sup> CD 56 <sup>+</sup> CD 16 <sup>-</sup>	5
CD 3 <sup>-</sup> CD 56 <sup>-</sup> CD 16 <sup>+</sup>	<1
CD 3 <sup>+</sup> CD 56 <sup>+</sup> CD 16 <sup>+</sup>	5

### 2. LAK 细胞的体外激活和培养

从外周血分离到的单个核细胞,在体外经过高浓度 IL-2(100—2000U/ml)的刺激后,表现出对肿瘤细胞强烈的杀伤功能。为什么在病人体内直接应用大剂量 IL-2 不能有效地刺激 LAK 细胞的前体细胞、而须在体外刺激才能得到具有杀伤活性的效应细胞? 一个主要的原因是体内全身应用 IL-2 不能达到足够的浓度而使 LAK 细胞的前体细胞分化成熟,因为 IL-2 在体内的半衰期很短,使得组织中不可能维持较高的浓度。另一方面,体内过高剂量的 IL-2 会造成一些明显的副作用,如毛细血管渗透性增加而造成的组织水肿、呼吸压迫和血压下降等都会给高剂量使用 IL-2 带来一定的限制。再者,体内肿瘤细胞产生的一些抑制性因子也不利于 LAK 细胞及其前体细胞激活。在

体外培养条件易于控制的条件下,其前体细胞可被有效地刺激而分化成熟。

LAK细胞在IL-2刺激15分钟后,就可表现出较明显的细胞毒活性。然而,继续培养能使细胞更成熟,细胞毒活性更强烈。一般对Daudi细胞的杀伤在培养24小时后出现,3~7天中,逐渐增强。对K<sub>562</sub>细胞的杀伤活性比对Daudi细胞稍迟<sup>[7]</sup>。

对于以治疗为目的的LAK细胞体外培养,有两个因素对疗效有较大的影响,即扩增的LAK细胞的数量和细胞毒活性。固着在培养板上的抗CD3单抗能有效地刺激LAK细胞的增殖和提高细胞毒活性。在培养的前7天中,增殖以CD3<sup>+</sup>细胞为主,培养过程中,CD4<sup>+</sup>细胞逐渐减少,CD8<sup>+</sup>和CD16<sup>+</sup>细胞则逐渐增加<sup>[8,9]</sup>。用抗CD3单抗和IL-2协同刺激LAK细胞时,其刺激应有顺序性,即须先用固着在培养板上的抗CD3单抗刺激2~3天后,再转移到只含IL-2的培养液中继续培养,才能得到较好的效果。如果抗CD3单抗和IL-2同时刺激LAK细胞则没有效果上的相加作用<sup>[10]</sup>。由此可见,LAK细胞在体外培养过程中,激活信号出现的时相差异会影响到细胞生物学功能的成熟。

可溶性细胞因子对LAK细胞的体外激活和增殖具有明显的调节作用。肿瘤坏死因子(TNF)主要由激活的淋巴细胞、巨噬细胞产生。在低剂量IL-2(10U/ml)培养的LAK细胞中加入500U/ml浓度的TNF- $\alpha$ 能明显加强LAK细胞的杀伤活性<sup>[11]</sup>。这可能是由于TNF- $\alpha$ 增加LAK细胞高亲和力IL-2受体的表达,从而提高LAK细胞对IL-2的敏感性<sup>[12]</sup>。另一方面,IL-2除了促进LAK细胞分泌TNF- $\alpha$ 外,也增强其受体的表达<sup>[13]</sup>。由此可见,IL-2和TNF- $\alpha$ 对LAK细胞功能的影响具有相互正调节的作用。转化生长因子(TGF- $\beta$ )则属于一类抑制性因子,它能有效地抑制IL-2诱导的LAK细胞的增殖和细胞毒活性的成熟。它由正常细胞或肿瘤细胞产生,抑制T淋巴细胞

表达IL-2受体和转铁蛋白受体<sup>[14]</sup>。LAK细胞激活过程可分作两步:首先是使细胞获得细胞毒活性,然后是已具有细胞毒活性的细胞更加成熟及细胞数的扩增。细胞扩增受到IL-2R表达的调节,所以影响IL-2R表达的细胞因子如TGF- $\beta$ 能使LAK细胞降低对IL-2的敏感性。当然,TGF- $\beta$ 也可通过阻止细胞产生干扰素(INF)- $\gamma$ ,TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$ 间接抑制LAK细胞的激活和增殖<sup>[15]</sup>。

## 二、TIL细胞

### 1. TIL细胞的特征

肿瘤组织中浸润淋巴细胞的多少与肿瘤患者的预后有直接的关系。有人发现浸润的淋巴细胞多时,病人的预后就好,反之,则较差<sup>[16]</sup>。这说明存在于肿瘤组织中的淋巴细胞在抵抗肿瘤的危害中有重要的作用,也就是说这些淋巴细胞可能具有抗肿瘤的活性。然而,由于肿瘤的快速生长和它分泌的一些抑制性因子,使淋巴细胞的数量相对显得太少,杀伤功能不能充分发挥。80年代初,Rosenberg等<sup>[17]</sup>首先在小鼠肿瘤模型中发现TIL细胞能有效地控制肝和肺中转移灶的生长,使有些小鼠的转移灶和原发灶完全消退。而且发现TIL抗肿瘤作用比LAK细胞强50~100倍。此后,很多研究者获得相似的结果。近几年来,很多研究把TIL细胞应用于临床,已取得了一定的疗效。

从肿瘤组织中分离到的TIL细胞主要是CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞,但也有CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>和CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>的细胞。这部分细胞中,CD4<sup>+</sup>细胞多于CD8<sup>+</sup>细胞。但在有些病例中,TIL的表达较为异常。如有人在一例皮肤巨细胞性淋巴瘤中分离到的TIL细胞为CD3<sup>-</sup>CD30<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>IL-2R<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>,经过培养后大部分细胞表型为CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>,而且同时表达CD5,CD7,CD45RO,CD11a,CD25,有的细胞在表达CD45RO的同时也表达CD45RA<sup>[20]</sup>。一般而言,TIL细胞经过培养后,CD4<sup>+</sup>细胞减少,CD8<sup>+</sup>细胞增加,呈CD8<sup>+</sup>

多于 CD 4<sup>+</sup> 细胞。但有些病例的 TIL 细胞培养后 CD 4<sup>+</sup> 细胞明显高于 CD 8<sup>+</sup> 细胞<sup>[19]</sup>。有的研究表明 TIL 细胞表型的不一致性与肿瘤的组织分型、侵害部位和 TIL 细胞在体外的生长状态无明显关系<sup>[19]</sup>。目前还不清楚 TIL 细胞表型多样性的原因。但它们都有一个共同的特点, 即表达 T 细胞抗原受体(TCR)。它由一条  $\alpha$  链和一条  $\beta$  链, 或  $\gamma$  链和  $\delta$  链组成。每条链都包含一个可变区(V 区)和一个恒定区(C 区)。有人从 15 例黑色素瘤 TIL 细胞发现有 14 例都表达 V $\alpha$ 7 基因, 而在 14 例胶质瘤的 TIL 细胞只有 6 例表达 V $\alpha$ 7 基因<sup>[21]</sup>, 提示  $\alpha$  链 V 区基因在不同肿瘤的 TIL 细胞中表达上的差异。同时也发现  $\beta$  链 V 区基因表达在不同肿瘤间未见有明显差异<sup>[21]</sup>。但是,  $\beta$  链恒定区 C $\beta$ 1 基因和 C $\beta$ 2 基因可能有差别<sup>[22]</sup>。在儿童肿瘤中还发现  $\gamma\delta$ TCR 的 TIL 细胞<sup>[19]</sup>。

TIL 细胞对肿瘤细胞的识别主要通过其抗原受体。除此之外, 一些粘附分子如 CD 2 与 CD 28 和 CD 11 a/18 与 CD 54 之间的相互作用会增加 TIL 细胞和肿瘤细胞间的结合, 有利于对肿瘤细胞的杀伤<sup>[23]</sup>。TIL 细胞与肿瘤细胞结合后, 其细胞核会偏向与肿瘤细胞结合相反的一侧, 而细胞中的活性颗粒、高尔基体和微管侧朝肿瘤细胞方向移动。受杀伤的肿瘤细胞变圆, 胞内出空泡, 细胞核发生裂解。

在临床应用中发现回输的 TIL 细胞最初在肺部大量聚集, 以后在肝脏和脾脏中出现。在肺部的聚积在 24 小时后逐渐减少, 48—72 小时在肿瘤部位的积聚达到高峰, 一般高峰期可维持 5—9 天<sup>[24]</sup>。如果回输细胞后并注射 IL-2 则可使 TIL 细胞在肺部和肿瘤局部积聚增高 5—10 倍<sup>[25]</sup>。肿瘤局部灌注使 TIL 细胞在肿瘤部位的积聚浓度升高, 维持时间延长。在动物实验中发现 CD 4<sup>+</sup> 和 CD 8<sup>+</sup> TIL 细胞在肿瘤部位积聚高峰期的出现有一定的时间差<sup>[25]</sup>。CD 4<sup>+</sup> 细胞高峰期在回输后第 6 天, CD 8<sup>+</sup> 细胞在第 8 天。在第 8 天时, CD 4<sup>+</sup> 细胞表达的 IL-2 mRNA 比 CD 8<sup>+</sup> 细胞多 3—6

倍, IL-6 mRNA 多 6—8 倍。而 CD 8<sup>+</sup> 细胞表达 IL-2 R mRNA 比 CD 4<sup>+</sup> 细胞多 6—8 倍, IFN- $\gamma$  mRNA 多 4—6 倍。如果 TIL 细胞在培养过程中加 10% 小牛血清, 回输后 24 小时细胞分泌的 IL-2 极少, IL-1 和 IFN- $\gamma$  的分泌影响较小。回输后并注射 IL-2 能使 CD 8<sup>+</sup> 细胞表达更多的 IL-2 R mRNA, 但对 CD 4<sup>+</sup> 细胞影响不大<sup>[26]</sup>。

## 2. TIL 细胞的分离和扩增

TIL 细胞分布于肿瘤组织间隙中, 体外培养时首先必须把它们与肿瘤细胞分开。常用的方法是把肿块剪成 1—3 mm<sup>3</sup> 的小组织块, 之后把它们置于含 0.1% IV 型胶原酶(collagenase type IV)、0.02% I 型 DNA 酶(DNAse type I)和 0.01% V 型透明质酸酶(hyaluronidase type V)的 RPMI 1640 培养液中消化 6—16 小时。消化结束前加 10% 血清, 再用无 Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup> 的 Hank's 液洗 2—3 次<sup>[2]</sup>。为了得到较高纯度的 TIL 细胞, 可用 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液。在这一步骤中, 往往会使 TIL 细胞得率下降 40—60%。所以有人认为在细胞成活率达 70—90% 时, 可以不用 Ficoll-Hypaque<sup>[2]</sup>。在培养过程中肿瘤细胞逐渐死亡, 最后成活的细胞基本上全部是 TIL 细胞。但开始培养时肿瘤细胞数量会直接影响到 TIL 细胞生长。

TIL 细胞在培养第一周时细胞密度以 0.5—3.0  $\times 10^6$ /ml 为宜。第二周可以降低到 0.2  $\times 10^6$ —0.5  $\times 10^6$ /ml。一般培养 7—14 天后成活的细胞主要是淋巴细胞。培养液采用 RPMI 1640, 其中加 IL-2 100—2000 U/ml。一周后加 20% (V/V) 的 LAK 细胞条件培养液。培养时 IL-2 浓度的考虑很重要。有时发现高浓度(1000—2000 U/ml) IL-2 培养时, TIL 细胞对自体肿瘤细胞杀伤的特异性下降, 表现为非抗原特异非 MHC 约束的细胞毒活性, 其原因可能是多方面的。譬如高浓度 IL-2 可能使 TIL 细胞表面非特异性粘附分子的表达增高, 使它与肿瘤细胞容易结合。但主要的原因可能是从肿瘤中分离

到的 TIL 细胞成分不一致。因为肿瘤部位除了有特异性细胞毒 T 细胞浸润外,还可有其他细胞存在,如 NK 细胞。NK 细胞在 HLA 低表达的肿瘤组织中浸润尤为明显,因为 NK 细胞能较敏感地识别和杀伤 HLA I 类分子不表达的细胞<sup>[28]</sup>。因而,在多种细胞亚群共同存在的情况下进行的 TIL 细胞杀伤特异性测定很容易出现非特异性杀伤的结果。建株的 TIL 细胞克隆杀伤特异性结果表明它们只杀伤自体的原来部位的肿瘤细胞,而对身体的其他肿瘤及异体的肿瘤细胞都没有杀伤作用。抗 CD 3 单抗能封闭它们对自体肿瘤细胞的杀伤<sup>[29]</sup>。因此,高浓度 IL-2 培养可能更容易激活非特异性细胞毒细胞。低浓度 IL-2(10—20 U/ml)培养则能获得较好的杀伤特异性,但细胞的扩增受到一定的影响。

为了在低浓度下获得足够治疗数量的 TIL 细胞,可在培养中协同应用其他的细胞因子。IL-4 能协同 IL-2 改善细胞增殖,增强细胞杀伤活性,降低非特异性杀伤<sup>[30,31]</sup>。IL-7 能促进淋巴细胞表达 IL-2 R,在培养中减少 CD 56<sup>+</sup>细胞的比例,增加 CD 3<sup>+</sup>细胞比例,但 IL-2 单独应用不能促进 TIL 细胞的增殖<sup>[32]</sup>。有人用肿瘤引流淋巴结细胞在 IL-7 刺激下,回输体内后表现出与 IL-2 诱导的细胞相同的抗肿瘤效果<sup>[33]</sup>。TNF- $\alpha$  能促进建株的 CD 8<sup>+</sup> 细胞毒细胞的增殖,增强其对自体肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[31]</sup>。

### 三、临床应用概况

尽管采用手术、放疗和化疗等综合治疗,仍有大约一半肿瘤病人最终死于转移病变。过继性免疫治疗有可能给这部分病人带来新的希望。

1. 最先应用于临床的是 LAK 细胞的过继性免疫治疗。自1985年以来,应用此疗法进行体内、外试验和 2000 多例晚期癌肿病人的临床 II 期研究证明,该疗法具有一定的抗癌效应<sup>[33]</sup>。Rosenberg 等人 1989 年报告<sup>[34]</sup>五年间应用大剂

量 IL-2 和 LAK 细胞 18 天疗法: IL-2 100 000 U/kg·8 h (或 1000000—6000000 U/m<sup>2</sup>·d) IV × 5 天,第 6—10 天取病人外周血淋巴细胞,经培养增殖 LAK 细胞,第 14—18 天再次输入上述数量的 IL-2,同时,在第 14、15、17 天将 LAK 细胞回输给病人,结果 177 例晚期癌肿病例,转移瘤完全消退 14 例(7.3%),部分消退(体积缩小 50% 以上)30 例(16.9%),总治疗效应率 25%,除对肾癌、黑色素瘤有治疗效应外,对直肠结肠癌和非何杰金氏淋巴瘤也有治疗反应。而单用 IL-2 一组 130 例,治疗效应率仅 17%,而且局限于肾癌和黑色素瘤。

为减轻大剂量 IL-2 引起的副反应,Schoof 等人<sup>[35]</sup>报告应用低剂量 rIL-2(30000 U/kg·8 h)和 LAK 细胞( $4 \times 10^{10}$  左右)19 天疗法治疗 28 例晚期病例,癌灶客观消退率 13 例(46%),其中 4 例(14.2%)转移灶完全消失,分别维持 2—9 个月,主要病例是黑色素瘤和肾癌。

Eberlein<sup>[36]</sup>临床试验也证实低剂量 rIL-2 引导的 LAK 细胞治疗和高剂量 rIL-2 引导的 LAK 细胞治疗同样有明显的血液学和免疫学的变化,保持导致癌肿消退的能力。有现象表明首次注射 IL-2 后病人外周血淋巴细胞计数弹性回升越高,其 LAK 细胞对癌瘤的杀伤力越大,疗效越佳,所以 LAK 细胞过继性免疫治疗效应依赖于宿主抗肿瘤 T 淋巴细胞活性的再生<sup>[37,38]</sup>。

该疗法的副反应主要归因于 rIL-2,而且随 rIL-2 剂量的增加副反应则加剧,据 Rosenberg<sup>[33]</sup>652 例高剂量 rIL-2 副反应有(1)普遍存在恶心、呕吐、腹泻和不适,可对症治疗;(2)一时性器官功能损害十分普遍,表现于胆红素和肌酐升高,停止治疗后可恢复正常;(3)周围血管阻力减低、心率加速、少尿、低血压、毛细血管渗透性增加导致液体渗入软组织,大部分病例体重增加 5%,有部分病人需要用加压素维持尿量和血压;(4)有 10 个病例死于治疗有关并发症,占有疗程的 1.5%,

占所有病例的1%。而 Schoof<sup>[34]</sup>低剂量 rIL-2 一组副作用相对较轻, 仅1例需要加强监护。

2. 鉴于 LAK 细胞临床疗效有限, 对晚期肾癌总效应率 < 25%, 而且需要 rIL-2 数量大带来严重副反应, 人们希望寻求一种抗肿瘤活性强于 LAK 细胞且对 IL-2 需求量小的效应细胞。临床前期研究已经证实 rIL-2 激活的肿瘤浸润淋巴细胞即 TIL, 其抗肿瘤效应比 LAK 细胞强 50—100 倍<sup>[17]</sup>, 而支持 TIL 抗肿瘤活性所需的 rIL-2 数量仅需支持 LAK 细胞的 1/100<sup>[30]</sup>。

基础和临床研究<sup>[39,40]</sup>还证实应用 TIL 过继性免疫治疗在下列几方面优于 LAK 细胞。(1) TIL 经 IL-2 培养后的生长扩增能力强于 LAK 细胞, 较易达到治疗所需的效应细胞数量;(2) IL-2 扩展的 TIL 95% 是细胞毒 T 细胞, 比 LAK 细胞更能裂解自体新鲜肿瘤细胞, TIL 表现对自身肿瘤靶细胞的攻击特异性, 而 LAK 细胞缺乏这种特异性, 因此对 LAK 细胞治疗无效的晚期癌肿 TIL 仍有一定治疗效果;(3) 化学药物如环磷酰胺作为免疫调节剂, 阻抑抑制细胞的功能, TIL 与之联合应用可明显提高 TIL 的抗肿瘤效应, 而 LAK 细胞缺乏这方面功能;(4) 可利用手术切除或活检的原发或继发病灶, 癌性胸腹水等取得淋巴细胞制备 TIL 并可冷藏重复使用而避免制备 LAK 所需要的抽取患者大量外周血淋巴细胞的繁琐过程, 更适合体质虚弱的晚期癌症患者。

Topalian<sup>[27]</sup>等人报告 12 例晚期转移癌肿病例(包括 6 例黑色素瘤、4 例肾癌、1 例乳癌、1 例结肠癌)应用 TIL 治疗情况, 肿瘤组织中的淋巴细胞经 4—5 周培养增殖, 收获 TIL 平均  $4 \times 10^{10}$  细胞, 经静脉在 1 h 内注输给病人, 依据病人情况和 TIL 细胞总数, 在 1—2 天内注输 1—4 次。首次注输 TIL 后即开始静注 rIL-2 1 万—10 万 U/kg, 8 h, 稀释在 0.9% NS 50 ml 和 5% 白蛋白中, 注输 15 分钟。每个疗程持续 2—9 天。其中 8 例尚在 TIL 注输前 36—

48 h, 静脉注射环磷酰胺(CPM) 25—50 mg/kg。治疗结果, 转移癌消退 50% 以上者两例(黑色素瘤和肾癌各 1 例), 这两例均联合应用 CPM, 且 rIL-2 和 TIL 量超过平均值。治疗副反应归因于 rIL-2, 血管内液体外渗平均体重增加 8%, 呼吸困难 1 例需要插管, 低血压 9 例需要加压素维持血压。没有因 TIL 直接引起的副反应。

1989 年 Kradin 等人<sup>[9]</sup>总结 28 例应用 TIL 治疗结果。采用 17 天疗法, 1—5 天, 8—12 天, 15—17 天静脉滴注 IL-2 ( $1 \times 10^6$ — $3 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>·24 h), 在 1、3、5、8、10、12、15 天注输 TIL ( $1 \times 10^{10}$  细胞)。TIL 7 例来自原发病灶, 21 例来自继发病灶, 95% 培养的淋巴细胞是 T 细胞。结果 13 例黑色素瘤中 23%, 7 例肾癌中 29% 达到客观治疗效应(肿瘤体积退缩 50% 以上), 持续 3—14 个月副反应非常有限, 发烧畏寒较常见, 无一例需要监护。

我们<sup>[11]</sup>自 1992 年 12 月应用 TIL 治疗 5 例晚期肾癌病例, 回输 TIL 细胞数  $6 \times 10^8$ — $1.9 \times 10^9$ , 随访至今 1 例有客观治疗效应, 3 例病情稳定, 1 例病情进展。

TIL 过继性免疫治疗机制目前仍不十分清楚, 同位素标志 TIL<sup>[8]</sup>发现注输后 TIL 迅速分布到肺、肝和脾, 5 分钟后在循环血流中仅有原水平 10%,  $\gamma$  摄象并不发现 TIL 在肿瘤组织中的特殊集聚, 说明 TIL 的效应主要不是直接分解肿瘤细胞, 更可能是加强机体对宿主肿瘤的调节反应。在治疗前周围血激活淋巴细胞的百分比在有治疗效应的病例一致比无治疗效应的病例高, 这一发现支持上述假设。此外病理学发现在有治疗效应的黑色素瘤灶中淋巴细胞浸润、肿瘤坏死和皮内小血管的淋巴性血管炎提示激活的淋巴细胞浸润入肿瘤相关小血管导致血管创伤也可能是导致肿瘤消退的机制之一。

还有许多问题需要解决, 比如 TIL 数量与表型以及 rIL-2 剂量同治疗效应有无关系仍有争论, 为什么不同作者报告疗效相差明显, 培

养的 TIL 的异质性给比较带来困难, 还有为什么临床效果与体外试验不尽一致, 如 Topalian 等<sup>[10]</sup>发现 9 例在体外能杀死在自身肿瘤的 TIL, 仅 2 例有治疗效应, 而另 1 例 TIL 在体外缺乏抗自身肿瘤活性, 注射后病人出现暂时性治疗效应。目前报告 TIL 应用最多、疗效最佳是黑色素瘤和肾癌, 对其他肿瘤作用甚微, 有无可能配合其他化学药物或细胞因子、抗体等扩大应用范围提高疗效, 这些均有待基础和临床进一步研究探讨。

### 摘 要

本文简述 LAK 细胞、TIL 细胞的基本特征, 以及经过体外淋巴因子激活后它们细胞毒功能的变化。概要叙述它们在体外培养过程中的一些影响其活性的因素及治疗晚期肿瘤的临床应用情况。

### 参 考 文 献

- [1] Darrow, T. L. et al., 1992, *Cancer*, 69: 1843.
- [2] Das, M. R. et al., 1991, *Immunol Letters*, 30: 37.
- [3] Loeffler, C. M. et al., 1992, *J Immunol.*, 149: 949.
- [4] Bean, P. et al., 1992, *Int J cell Cloning*, 10: 190.
- [5] Damle, N. K. et al., 1986, *J Immunol.*, 137: 2814.
- [6] Ortaldo, J. R. et al., 1986, *J Exp Med.*, 164: 1193.
- [7] Yannelli, J. R. et al., 1989, In "Adoptive Cellular Immunotherapy of Cancer", ed., Stevenson, H. C., Marcel Dekker Inc., pp 191.
- [8] Mikumo, S., 1992, *Hum Cell.*, 5: 256.
- [9] Yamazaki, T. & Sekine, T., 1992, *Neurol Med chiv Tokyo.*, 32: 255.
- [10] Yashizawa, H. et al., 1991, *J Immunol.*, 147: 729.
- [11] Owen-Schoub, L. B. et al., 1988, *Cancer Res.*, 48: 788.
- [12] Scheurich, P. et al., 1987, *J Immunol.*, 138: 1786.
- [13] Owen-Schoub, L. B. et al., 1991, *cell Immunol.*, 132: 193.
- [14] Kehrl, J. H. et al., 1986, *J Exp Med.*, 163: 1037.
- [15] Palladino, M. A., 1987, *J Exp Med.*, 166: 571.
- [16] Miwa, H., 1984, *Acta Med Okayama.*, 38: 215.
- [17] Rosenberg, S. A. et al., 1986, *Science*, 233: 1318.
- [18] Manna, R. et al., 1992, *Ann Ital Med Int.*, 7: 19.
- [19] Rivoltini, L. et al., 1992, *Cancer Immunol Immunother.*, 34: 241.
- [20] Reinhold, U. et al., 1991, *Cancer*, 68: 2155.
- [21] Nitta, T. et al., 1991, *Int J Cancer.*, 49: 545.
- [22] Vennett, W. F. et al., 1992, *cancer*, 69: 2379.
- [23] Schirren, C. A. et al., 1992, *Blood*, 79: 138.
- [24] Urba, W. J. & Longo, D. L., 1990, *Biol Response Medifiers Ann*, 11: 265.
- [25] Alexander, R. B. & Rosenberg, C. A., 1991, *J Immunother.*, 10: 389.
- [26] Rong, G. H. et al., 1985, *J Surg Oncol.*, 28: 131.
- [27] Topalian, s. L. et al., 1988, *J Clin Oncol.*, 6: 839.
- [28] Karre, K. 1991, *Semi Cancer Biol.*, 2: 295.
- [29] Finke, J. H. et al., 1992, *J Immunother.*, 11: 1.
- [30] Tso, C. L. et al., 1992, *J. Immunother.*, 12: 82.
- [31] Ioanmider, C. G. et al., 1991, *Lymphokine Cytokine Res.*, 10: 307.
- [32] Dittorino, P. et al., 1992, *Urol Res.*, 20: 205.
- [33] Rosenberg SA, 1985, *J Exp Med.*, 161: 1169.
- [34] Rosenberg SA, et al., 1989, *Ann Surg.*, 210-474.
- [35] Schoof DD, et al., 1988, *Cancer Research*, 48: 5007.
- [36] Eberlein TJ, et al., 1989, *Cancer Immunol Immunother*, 30: 145.
- [37] Boldt DH, 1988, *Cancer Res.*, 48: 4409.
- [38] Chang AC, 1986, *Cancer Res.*, 46: 3426.
- [39] Kradin RL et al., 1989, *Lancet*, 1: 577.
- [40] 曹雪涛等, 1990, *中国免疫学杂志*, 6: 105.
- [41] 张永康等, 肿瘤浸润淋巴细胞治疗晚期肾癌——初步报告。华东六省一市泌尿外科学术会议, 1993, 6, 烟台。