

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.001

· 专家论坛 ·

## 肿瘤生物治疗的新模式:分子靶向-过继性细胞免疫治疗

黄宇贤, 郭坤元(南方医科大学珠江医院血液科, 广东 广州 510282)



郭坤元, 南方医科大学珠江医院血液科主任医师、教授、博士(后)研究生导师、中央保健会诊专家, 担任中国肿瘤生物治疗专业委员会常委、中国医药生物技术协会临床应用专业委员会常委、中国医院协会技术委员会委员、中华医学会干细胞移植专业委员会委员、广东省血液学会常委和器官移植学会常委、中国抗癌协会广州分会副理事长、美国血液学会及美国生物工程学会会员等学术职务。从事实体肿瘤和血液肿瘤的医疗、科研、教学工作 40 多年, 于 1993、1995、1998、2005 年分别到香港、美国、日本的著名血液病中心和骨髓移植中心学习和交流, 擅长肿瘤过继性免疫治疗和血液病骨髓移植治疗。创建了: (1) 遗传上半匹配造血干细胞移植; (2) 过继性免疫化疗治疗白血病、淋巴瘤的新方法。发表学术论文 100 多篇, 主编和参编学术专著 5 部, 承担国家、省部(军队)级科研基金项目 12 项, 获省部(军队)级科技成果奖 6 项。E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

[摘要] 分子靶向-过继性细胞免疫治疗是分子靶向药物和过继性细胞免疫疗法有机结合的新治疗模式, 该模式建立在 NK 细胞活化性信号通路( NKG2D-NKG2DLs ) 的生物学特性, 尤其是受配体可调控性的理论基础之上。分子靶向药物在其中扮演双重角色, 除了药物本身对肿瘤细胞的毒性作用外, 还作为“刺激诱导”源, 诱导肿瘤细胞表达免疫激活物 NKG2DLs( natural killer group 2 member D ligands ), 与 NK 细胞表面 NKG2D( natural killer group 2 member D ) 结合, 激活 NK 细胞的杀伤活性。NKG2D 与 NKG2DLs 是 NK 细胞主要的活化性受、配体, 在机体抗肿瘤免疫中起重要作用。NKG2D 主要表达于 NK、CD8<sup>+</sup>T、 $\gamma\delta$ T 和活化的巨噬细胞, 参与适应性及固有性免疫应答。与 NKG2D 结合的配体( NKG2DLs ) 广泛低表达于多种肿瘤细胞, 而在正常组织细胞几乎未见表达, 靶细胞的 NKG2DLs 表达水平直接关系到免疫效应细胞( NK、DC、CTL 细胞等) 对其的杀伤活性。NKG2DLs 的转录与表达可受多种因素影响, 分子靶向药物可以诱导肿瘤细胞高表达 NKG2DLs, NK 细胞对高表达 NKG2DLs 的肿瘤细胞有较高杀伤活性, 而对正常组织无杀伤作用, 具有杀伤靶向性; NKG2DLs 的高表达也增强了肿瘤细胞对其他免疫效应细胞的杀伤敏感性, 具有良好的应用前景。分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗将使肿瘤患者获得更好的临床疗效, 预示了肿瘤生物治疗新的发展方向——分子靶向-过继性细胞免疫治疗新模式的来临。

[关键词] 分子靶向药物; 过继性细胞免疫治疗; 肿瘤生物治疗; NK 细胞; NKG2D-NKG2DLs

[中图分类号] R730.54; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0243-07

## New strategy for cancer biotherapy: Combining usage of molecular targeted agents and adoptive cellular immunotherapy

HUANG Yu-xian, GUO Kun-yuan ( Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China )

[Abstract] As a promising new strategy for cancer biotherapy, combined therapy of molecular targeted agents and adoptive cellular immunotherapy is established based on the biological characteristics of NK cell activating signal pathway ( natural killer group 2 member D-natural killer group 2 member D ligand, NKG2D-NKG2DLs ), especially its regulable ligand and receptor theory. Molecular targeted agents play dual functions: in addition to their toxic effects against tumor cells, they can also induce expression of NKG2D ligands on tumor cells, resulting in enhanced immune eradication of NK cells. As a pivotal activating receptor for NK cells, NKG2D and its ligands play important roles in the anti-tumor immune system, especially adoptive cell-mediated immune response. NKG2D is mainly expressed by NK cells, CD8<sup>+</sup>T cells,  $\gamma\delta$  T

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目( No. 30973454 ); 广东省自然科学基金重点项目( No. 9251051501000007 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30973454 ), and the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province ( No. 9251051501000007 )

cells and activated macrophages. As for NKG2D ligands, they have restricted expressions in normal tissues, but are frequently expressed on primary tumors. Therefore, expressions of these ligands are closely related to the anti-tumor effect of immune cells, without damage to the normal tissues. NKG2D ligands can be regulated by multiple stimuli including molecular targeted agents. The immunoregulation induced by molecular targeted agents through NKG2D-NKG2DLs pathway has been shown valuable both for its distinguished targeting effects and for its well-established regulating effects. In summary, combination of molecular targeted agents and adoptive cellular immunotherapy may represent a bright future for tumor biotherapy.

[ Key words ] molecular targeted agent; adoptive cellular immunotherapy; cancer biotherapy; natural killer cell; NKG2D-NKG2DLs

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 243-249 ]

生物治疗是继传统手术、化疗、放疗之后又一类新兴的肿瘤治疗方法,其主要包括分子靶向治疗、过继性细胞免疫治疗、基因治疗、细胞因子、疫苗治疗等。分子靶向治疗以高度的肿瘤靶向性为依托,良好的机体耐受性是其巨大优势,尤其适用于治疗处于瓶颈阶段而一般状况又较差的耐药和复发性恶性肿瘤患者<sup>[1]</sup>。分子靶向治疗的临床有效性受多种因素影响,其对表达特异性靶点的肿瘤疗效虽佳却终将面临产生耐药性的问题<sup>[2]</sup>。过继性细胞免疫治疗杀伤机制不同于化学治疗,不存在耐药性问题,但不同个体间的疗效差异很大。NCI(national cancer institute)统计显示,过继性细胞免疫治疗的有效率为7%~40%<sup>[3]</sup>。建立一种科学的理论基础,作为分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗的桥梁,使这两种治疗方法能够优势互补、协同杀伤耐药或复发的肿瘤细胞,成为肿瘤生物治疗研究者迫切需要解决的问题。

NK细胞作为机体天然免疫的主要承担者,是过继性细胞免疫治疗的重要效应细胞。NK细胞发挥杀伤功能是建立在人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)-杀伤细胞免疫球蛋白(killer cell immunoglobulin-like receptor,KIR)错配的基础上<sup>[4]</sup>;同时,抑制性和活化性受、配体的平衡对NK细胞的杀伤活性也至关重要<sup>[5]</sup>。NKG2D(natural killer group 2 member D)是NK细胞主要的活化性受体,相应配体NKG2DLs(NKG2D ligands)广泛低表达于多种肿瘤细胞,在正常组织细胞几乎未见表达,肿瘤细胞的NKG2DLs表达水平直接关系到免疫活性细胞的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>。另外,多种因子能调节肿瘤细胞上NKG2DLs的表达,增强肿瘤细胞对NK细胞的杀伤敏感性。本文以NK细胞活化性信号通路(NKG2D-NKG2DLs)的生物学特性为理论依据,分析分子靶向药物如何调控肿瘤细胞NKG2DLs的表达以实现过继性细胞免疫治疗的增效作用,阐

述当前肿瘤生物治疗的新模式:分子靶向-过继性细胞免疫治疗。

### 1 NKG2D-NKG2DLs 活化性信号通路的生物学特性及作用

NK细胞发挥功能主要依赖其表面受体与靶细胞表面MHC(或非MHC)类配体的结合,传递活化性或抑制性信号,调节NK细胞的活性<sup>[7]</sup>。在众多NK细胞抑制性和活化性受配体当中,研究得较彻底的是HLA-KIR信号通路,该通路传递抑制性信号,抑制NK细胞的活性。另外一个NKG2D-NKG2DLs信号通路,该通路传递活化性信号,激活NK细胞的杀伤活性<sup>[8-10]</sup>(表1)。

表1 NK细胞HLA-KIR抑制性受配体和NKG2D-NKG2DLs活化性受配体

抑制性受配体		活化性受配体	
受体 (NK细胞)	配体 (肿瘤细胞)	受体 (NK细胞)	配体 (肿瘤细胞)
KIR2DL1	HLA-Cw2,4,5,6,15	NKG2D	MICA/B
KIR2DL2/L3	HLA-Cw1,3,7,8	NKG2D	ULBP1
KIR2DL4	HLA-G	NKG2D	ULBP2
KIR2DL5	HLA-C2, Bw4	NKG2D	ULBP3
KIR3DL1	HLA-Bw4	NKG2D	ULBP4
KIR3DL2	HLA-A3, 11	NKG2D	ULBP5
KIR3DL3	HLA-C2, Bw4	NKG2D	ULBP6

NKG2D是C型凝集素受体,其编码基因定位于第12号染色体短臂(12p12.3-p13.1)。NKG2D在NK细胞的表达率达90%,是NK细胞主要的活化性信号分子<sup>[11]</sup>;也表达于其他免疫效应细胞上,如CD8<sup>+</sup>T、 $\gamma\delta$ T、活化的巨噬细胞(表2);参与适应性及固有性免疫应答,调节NK细胞、T细胞和树突状细

胞的功能<sup>[12-13]</sup>。NKG2D 作为免疫效应细胞的主要活化性受体,主要功能为:(1)作为活化性受体与 NKG2DLs 结合,激活 NK 细胞发挥杀伤功能;(2)作为协同刺激分子传递第二信号,活化巨噬细胞和 T 细胞<sup>[14]</sup>。NK 细胞活化性信号通路(NKG2D-NKG2DLs)介导的杀伤活性强于 HLA-KIR 抑制性信号通路介导的抑制作用<sup>[15]</sup>。NK 细胞杀伤功能的启动主要通过 NKG2D 与靶细胞表面 NKG2DLs 的结合,激活下游活化性信号通路发挥细胞毒作用,即 NK 细胞对靶细胞杀伤活性的高低取决于靶细胞 NKG2DLs 的表达水平<sup>[16]</sup>。

表 2 人类和小鼠免疫细胞表面 NKG2D 的分布

细 胞	人 类	小 鼠
NK	所有 NK 细胞	所有 NK 细胞
TCR $\alpha\beta$ T	初始、活化和记忆性 CD8 <sup>+</sup> T 细胞,类风湿关节炎患者循环和滑液中 CD4 <sup>+</sup> T 细胞	表达于活化和记忆性 CD8 <sup>+</sup> T 细胞,不表达于初始 CD8 <sup>+</sup> T 细胞和 CD4 <sup>+</sup> T 细胞
TCR $\gamma\delta$ T	大多数血液和肠上皮内淋巴细胞	25%的脾脏细胞
NKT	大多数 NKT 细胞	大部分 NKT 细胞
DC	部分活化的 DC	IKDC 亚群
巨噬细胞	活化的巨噬细胞	表达 NKG2D mRNA

与 NKG2D 相结合的膜蛋白分子配体,即 NKG2DLs,主要包括 MHC-I 链相关分子 A 或 B (MHC class I-related chain molecules A/B, MICA/B)和人巨细胞病毒糖蛋白 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBPs)<sup>[17]</sup>。正常细胞一般不表达 NKG2DLs,肠上皮细胞、呼吸道上皮和妊娠滋养层细胞仅少量表达 NKG2DLs<sup>[18]</sup>。许多因素可以影响 NKG2DLs 的转录与表达,包括细胞的转化和恶变、药物刺激、放射损伤、离子辐射、细菌和病毒感染、细胞因子、生物毒素、植物单体(苦参碱、冬凌草甲素、姜黄素)和 DNA 损伤<sup>[19]</sup>。不同的刺激因素对 NKG2DLs 的诱导作用不同,同一种刺激因素在不同细胞可以诱导不同种类 NKG2DLs 的表达,不同刺激因素在同一细胞也可诱导不同种类 NKG2DLs 的表达。NKG2DLs 的表达存在多样性,同一细胞可表达多种 NKG2DLs,也可单独表达某种 NKG2DL。

多种恶性肿瘤细胞低表达 NKG2DLs,包括神经

胶质瘤、白血病、恶性黑素瘤、成神经细胞瘤、口腔鳞状细胞癌、鼻咽癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结直肠癌及卵巢癌<sup>[20-22]</sup>。NKG2DLs 在机体抗肿瘤免疫中扮演非常重要的角色,主要体现在下面几个方面<sup>[19]</sup>:

(1) NKG2DLs 介导免疫反应。NKG2DLs 能激活表达 NKG2D 的 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞,使其产生 IFN- $\gamma$ ,增强效应细胞对肿瘤细胞的杀伤活性,并通过穿孔素杀伤肿瘤细胞。

(2) 肿瘤的逃逸作用。NKG2DLs 与内质网蛋白 5(endoplasmic reticulum protein 5, ERp5)和从肿瘤细胞表面脱落的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)相互作用,使 NKG2DLs 表达下调或阻断肿瘤细胞 NKG2DLs 与免疫效应细胞的结合。

(3) 免疫治疗作用。许多刺激因素可诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs,增强免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。NKG2D-NKG2DLs 介导抗肿瘤免疫的主要优势,表现在通过 NK 细胞受体和肿瘤细胞上配体的特异性结合, NK 细胞仅杀伤高表达 NKG2DLs 的肿瘤细胞,体现杀伤的靶向性。

## 2 分子靶向药物调节肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达

肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达水平很大程度上决定了肿瘤细胞对机体 NK 细胞的杀伤敏感性,并且肿瘤细胞上 NKG2DLs 的表达可以受多种因素的调节。文献<sup>[23-25]</sup>报道及笔者研究<sup>[26-29]</sup>发现,分子靶向药物对肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达具有诱导作用,且不同分子靶向药物对肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的诱导作用不同,其中以酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼的诱导作用最强。分子靶向药物上调肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的同时,肿瘤细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性也随之增高。分子靶向药物除了诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs 外,还具有下述生物学效应:(1)分子靶向药物作用于肿瘤细胞特异性靶点,如酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼通过抑制 VEGFR、PDGFR、Kit 和 RET 等酪氨酸激酶而阻断 Raf/MEK/ERK 信号通路,影响肿瘤细胞的增殖和转移。西妥昔单抗阻断肿瘤细胞表面的 EGFR,间接诱导免疫效应细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,增强免疫效应细胞的 ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity)效应<sup>[30]</sup>。Roda 等<sup>[25]</sup>先利用西妥昔单抗“包被”乳腺癌、肺癌和胰腺癌细胞,再与 NK 细胞共孵育, NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 的水平升高 3~10 倍,增强了 NK 细胞的 ADCC 效应。(2)分子靶向药物能直接抑制肿瘤细胞膜上转运蛋白的“药泵”,使抗肿瘤药物在靶细胞内聚集,

逆转肿瘤细胞耐药。文献<sup>[31-33]</sup>报道,吉非替尼、埃罗替尼、拉帕替尼等酪氨酸激酶受体抑制剂能抑制耐药乳腺癌细胞、小细胞肺癌细胞和人表皮样癌细胞上的多药耐药蛋白 ABCB1、ABCG2 的“药泵”作用,化疗药物不能被泵出细胞外,持续在细胞内聚集,增强化疗药物的疗效。另外,研究<sup>[34-35]</sup>发现,分子靶向药物上调耐药肿瘤细胞 ERK 蛋白的表达和活性,使耐药肿瘤细胞表面 NKG2DLs 的表达水平高于亲本细胞,增强耐药肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。

### 3 分子靶向药物调控肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的分子机制

多种因素(包括分子靶向药物)能诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs,但其分子机制仍莫衷一是<sup>[36]</sup>。Gasser 等<sup>[37]</sup>认为,DNA 损伤修复反应诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs。在低或高剂量化学药物的刺激下,细胞的 DNA 损伤反应可激活信号转导分子,如 ATM 或 ATR 激酶,这些激酶进一步活化下游的 CHK1、CHK2 激酶和凋亡相关分子,从而诱导 NKG2DLs 的表达。Weizman 等<sup>[38]</sup>报道,激活蛋白 1 (active protein-1, AP-1) 能联合 DNA 损伤修复反应,上调 NKG2DLs 的表达。NKG2DLs 基因启动子中含有多种转录因子的结合位点,包括活化转录因子 6 (activation transcription factor 6, ATF6)、热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1)、髓样锌指因子 1 (myeloid zinc finger 1, MZF1)、碱性核蛋白 (basonuclin, BNC) 和 NF- $\kappa$ B 等转录因子的结合位点,这些结合位点在不同条件下与相应的转录因子结合,调节 NKG2DLs 的表达<sup>[39]</sup>。多位学者等<sup>[40-41]</sup>认为,DNA 损伤修复反应可通过激活下游 NF- $\kappa$ B 调节 NKG2DLs 的表达。

综合目前调控 NKG2DLs 表达分子机制的相关文献和笔者的实验结果,笔者认为,对于分子靶向药物诱导 NKG2DLs 表达的分子机制,倾向于多重分子机制间协同调控 NKG2DLs 表达的理论(图 1)。分子靶向药物特异性阻断了肿瘤细胞的特异性靶点和相关的信号通路,而这些靶点和信号通路与调节 NKG2DLs 表达的关键信号分子间存在相互作用,共同调节 NKG2DLs 的表达。药物除具有细胞毒作用外,本身也是一种刺激源,可通过 DNA 损伤修复反应或其他信号通路调节 NKG2DLs 的表达。而且, NKG2DLs 表达的多样性决定了调控机制的多样性,使机体对不同刺激因素、不同环境作出适当的应答。笔者在探讨分子靶向药物诱导肿瘤细胞 NKG2DLs

表达的研究中发现,未处理的肿瘤细胞不能扩增出 NF- $\kappa$ B mRNA,但经分子靶向药物舒尼替尼处理之后可扩增出 NF- $\kappa$ B mRNA 和 P53 mRNA 片段,并且肿瘤细胞中 5 种 NKG2DLs 的表达水平都明显上调,对 NK 细胞杀伤的敏感性也明显增强,提示 NF- $\kappa$ B 对 NKG2DLs 的表达具有调节作用。

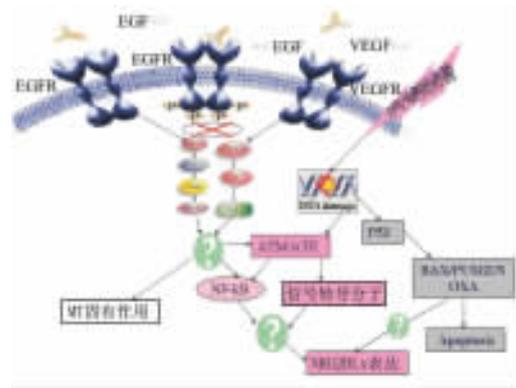


图 1 分子靶向药物诱导肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的分子机制

EGFR:表皮生长因子受体;EGF:表皮生长因子;

MT:分子靶向药物;ATM/ATR:运动失调性毛细血管

扩张症基因突变体/Rad3 相关基因;NKG2DLs:NKG2D 配体。

- (1) 分子靶向药物固有作用:分子靶向药物作用于肿瘤靶细胞后,抑制了肿瘤细胞的特异性靶点(如西妥昔单抗与 EGFR 结合、贝伐单抗与 VEGFR 结合)和相关的信号通路(Ras/Raf-MAPK、PI3K-AKT 等信号通路),抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性;
- (2) 分子靶向药物可通过激活 NF- $\kappa$ B、AP-1、GSK-3( glycogen synthase kinase-3)等信号分子诱导 NKG2DLs 的表达;
- (3) 分子靶向药物作用肿瘤细胞后,作为一种“刺激诱导”源,引起细胞 DNA 损伤反应,通过 DNA 损伤相关信号分子(如 ATM/ATR、CHK1/CHK2 等)诱导 NKG2DLs 的表达。

### 4 NKG2D 和 NKG2DLs 表达对过继性细胞免疫治疗疗效的预测作用

目前,仍未有一种有效的方法能够预测过继性细胞免疫治疗的疗效,导致了过继性细胞免疫治疗的盲目性,因此,疗效预测方法的建立对过继性细胞免疫治疗的规范化具有重要意义。过继性细胞免疫治疗的疗效取决于两个方面,一方面是过继性免疫细胞的质和量,另一方面是肿瘤组织的情况(包括肿瘤类型、瘤块大小、病理类型及免疫分子表型等)。

过继性免疫细胞的量,可以通过优化制备条件来获得更多的过继性免疫细胞。过继性免疫细胞的质主要是指细胞的功能状态。免疫效应细胞发挥杀伤作用是免疫活化性和抑制性受配体共同作用的结

果。NKG2D 是免疫效应细胞重要活化性受体, NKG2D 在免疫效应细胞中表达水平越高, 其杀伤活性越强<sup>[42]</sup>。在 CIK、NK 细胞制备过程中, 随着培养时间延长, NKG2D 表达水平增高, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> CIK 细胞中 NKG2D 表达率达 98%, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> CIK 细胞中 NKG2D 表达率达 76%; 同时 CIK、NK 细胞低表达其他非 MHC 依赖性的 NK 细胞激活受体, 如 NKp30(18%)、NKp44(10%)和 NKp46(18%); 无或弱表达抑制性受体, 如 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR3DL1、NKG2A 和 CD94。细胞成熟程度越高, 其 NKG2D 表达水平越高, 对 K562 细胞的杀伤活性越强<sup>[11]</sup>。因此, 过继性细胞免疫治疗中, NKG2D 可能是反映 CIK、NK 细胞成熟程度和功能状态的一个非常重要的指标, 可预测 CIK、NK 细胞的疗效。

从肿瘤组织方面分析, 决定肿瘤细胞对免疫效应细胞杀伤敏感性的是 HLA-KIR 的错配程度以及活化性配体的表达水平。HLA-KIR 错配方面, 自体 CIK、NK 细胞治疗不存在 HLA-KIR 错配; 异体 CIK、NK 细胞治疗多数有 HLA-KIR 错配, 但由于检测方法复杂, 临床较难推广。活化性配体的表达方面, NKG2DLs 是免疫细胞重要的活化性配体, 广泛表达于多数肿瘤组织。高表达 NKG2DLs 的肿瘤细胞对免疫效应细胞杀伤的敏感性高, 低表达 NKG2DLs 的肿瘤细胞对免疫效应细胞杀伤的敏感性低。此外, NKG2DLs 在肿瘤组织中的表达水平与疾病预后密切相关。NKG2DLs 高表达结肠癌患者比低表达 NKG2DLs 结肠癌患者的中位生存期、疾病进展时间和总生存期延长; 另外, NKG2DLs 表达水平较高的肿瘤患者, 其肿瘤 TNM 分期好于 NKG2DLs 表达水平较低的肿瘤患者<sup>[35]</sup>。因此, 检测肿瘤组织中 NKG2DLs 表达水平具有重要意义。临床中有望通过免疫组化的方法检测肿瘤组织中 NKG2DLs 的表达水平, 由此预测 CIK、NK 细胞治疗的疗效。本课题组已经利用此技术平台开展过继性细胞免疫治疗的疗效预测, 但目前收集的病例样本仍较少。

## 5 如何实现肿瘤的分子靶向-过继性细胞免疫治疗新模式

肿瘤的发生、发展是一个动态演变的复杂过程, 其中, 肿瘤细胞—肿瘤干细胞—肿瘤细胞相互之间的转化给肿瘤治疗带来了困难, 化疗失败的主要原因是肿瘤干细胞的存在和肿瘤细胞的多药耐药<sup>[43]</sup>。分子靶向药物治疗联合过继性细胞免疫治疗具有协同作用, 其杀伤肿瘤细胞的机制不同于细胞毒性药物, 主要通过主动或被动的方式激活机体的免疫应

答来杀伤肿瘤细胞, 适合对化学药物耐药的肿瘤患者, 这种治疗新模式是肿瘤治疗的发展趋势。

免疫效应细胞发挥功能首先需要激活, 靶细胞表面活化性配体的表达对免疫效应细胞的激活十分重要, 多种因素可以调控活化性配体的表达水平。以免疫效应细胞活化性受配体生物学功能和受配体可控性表达为纽带将分子靶向药物与过继性细胞免疫治疗(例如 NK 细胞)联合起来, 通过分子靶向药物调节活化性配体的表达, 增强免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤。本课题组前期研究发现, NKG2D 和 NKG2DLs 表达水平与 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤存在良好的线性关系, NKG2D 反映了 NK 细胞的功能状态, NKG2DLs 反映了肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性。在目前过继性细胞免疫治疗没有理想的疗效预测指标的前提下, NKG2D-NKG2DLs 信号分子的表达水平可能是较好的疗效预测指标。

分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗(NK 细胞)适合于肿瘤早期术后的患者、化学药物治疗抵抗的肿瘤患者、体质弱的晚期肿瘤患者、老年肿瘤患者。实施靶向-过继性细胞免疫治疗步骤如下: (1) 治疗前应检测不同类型肿瘤细胞表面分子靶向药物靶点表达的情况, 如 EGFR、VEGF、Her2、CD20 和 BCR-ABL 等。根据肿瘤细胞表达的靶点选择相应的分子靶向药物。(2) 评估患者免疫状态, 如采用流式细胞术检测患者淋巴细胞亚群、免疫效应细胞表面 NKG2D 的表达水平等。(3) 预测肿瘤患者对过继性细胞免疫治疗的敏感性。实体肿瘤患者可用免疫组化法检测肿瘤组织中 NKG2DLs 的表达水平, 血液肿瘤患者可用流式细胞术检测肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达水平。(4) 联合使用分子靶向药物和过继性细胞免疫治疗(如 NK 细胞、CIK 细胞或 DC-CIK 细胞输注), 两个疗程后进行疗效评价。

分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗是一种新兴肿瘤治疗模式, 其治疗效果如何仍是未知数。多位学者<sup>[44-47]</sup>发现, 进展期黑素瘤患者应用分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗可取得比单药更好的疗效, 主要原因是多数恶性肿瘤细胞中, Ras/Raf/MEK/ERK、Akt/PI3K、mTOR 等信号通路活性异常增高, 而分子靶向药物(如索拉非尼、舒尼替尼等多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂, 蛋白酶体抑制剂, 抗血管生成药物)联合过继性细胞免疫治疗可抑制肿瘤细胞中这些信号通路的表达, 下调肿瘤细胞抗凋亡蛋白表达, 诱导肿瘤细胞凋亡。但临床应用是否具有有良好的疗效, 需要大量临床病例的验证。

## 6 展望

NKG2D-NKG2DLs 活化性信号通路在抗肿瘤免疫反应中的重要性不容置疑。分子靶向药物除了药物本身对肿瘤细胞的细胞毒作用外, 还可以通过诱导肿瘤细胞高表达 NKG2DLs, 增强肿瘤细胞对免疫效应细胞杀伤的敏感性。这种由 NKG2D-NKG2DLs 介导的分子靶向药物对肿瘤细胞的免疫调节作用, 揭示分子靶向药物联合过继性细胞免疫治疗可以实现  $1+1>2$  的协同效应, 将给肿瘤患者带来更显著的临床效果, 也预示了肿瘤生物治疗新的发展方向——分子靶向-过继性细胞免疫治疗新模式的来临。当然, 靶向-过继性细胞免疫治疗是近年来刚刚兴起的肿瘤治疗模式, 其理论基础、分子机制、临床疗效以及相关疗效的预测还有待进一步深入研究。大部分肿瘤患者在经过手术、化疗、放疗之后才考虑进行生物治疗, 此时可能已错过了治疗的最佳时机; 此外, 分子靶向治疗和过继性细胞免疫治疗费用较高也成为分子靶向-过继性细胞免疫治疗实施的障碍之一。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 顾健人, 曹雪涛. 癌症治疗存在的问题以及生物治疗面临的机遇与挑战 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15( 1 ): 2-7.
- [ 2 ] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy [ J ]. Nat Rev Cancer, 2008, 8( 4 ): 299-308.
- [ 3 ] Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment [ J ]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97( 19 ): 1407-1427.
- [ 4 ] Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation [ J ]. Blood, 1999, 94( 1 ): 333-339.
- [ 5 ] Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: Current insights and future prospects [ J ]. J Intern Med, 2009, 266( 2 ): 154-181.
- [ 6 ] Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Baltar JM, Ortega F, López-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: New target for immunointervention [ J ]. Am J Transplant, 2009, 9( 2 ): 251-257.
- [ 7 ] 梅家转, 周健, 郭坤元. 自然杀伤细胞与肿瘤细胞之间的免疫编辑 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15( 1 ): 86-89.
- [ 8 ] Roetynck S, Baratin M, Johansson S, Lemmers C, Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells and malaria [ J ]. Immunol Rev, 2006, 214: 251-263.
- [ 9 ] Vidal-Castañeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Alonso-Arias R, Martínez-Borra J, Pérez R, et al. Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection [ J ]. J Virol, 2010, 84( 1 ): 475-481.
- [ 10 ] Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand [ J ]. Eur J Immunol, 2009, 39( 12 ): 3207-3216.
- [ 11 ] Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes [ J ]. Exp Hematol, 2009, 37( 5 ): 616-628.
- [ 12 ] Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T cell immunity [ J ]. Immunol Rev, 2002, 188( 1 ): 9-21.
- [ 13 ] Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing [ J ]. Immunity, 2002, 17( 1 ): 199-209.
- [ 14 ] Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance [ J ]. Oncogene, 2008, 27( 45 ): 5932-5943.
- [ 15 ] Ljunggren HG. Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover [ J ]. Immunity, 2008, 28( 4 ): 492-494.
- [ 16 ] Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells [ J ]. Immunol Rev, 2006, 214: 130-142.
- [ 17 ] Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: Analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity [ J ]. Cancer Res, 2002, 62( 21 ): 6178-6186.
- [ 18 ] Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: A possible novel immune escape mechanism for fetal survival [ J ]. J Immunol, 2006, 176( 6 ): 3585-3592.
- [ 19 ] Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity [ J ]. Oncogene, 2008, 27( 45 ): 5944-5958.
- [ 20 ] Vetter CS, Groh V, Thor Straten P, Spies T, Bröcker EB, Becker JC. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma [ J ]. J Invest Dermatol, 2002, 118( 4 ): 600-605.
- [ 21 ] Watson NF, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, et al. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients [ J ]. Int J Cancer, 2006, 118( 6 ): 1445-1452.
- [ 22 ] Castriconi R, Dondero A, Negri F, Bellora F, Nozza P, Carnemolla B, et al. Both CD133( + ) and CD133( - ) medulloblastoma cell line express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity [ J ]. Eur J Immunol, 2007, 37( 11 ): 3190-3196.

- [ 23 ] Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, Bodalski J. Influence of interleukin IL-2 and IL-12 + IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells [ J ]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006( 4 ): 46957-46962.
- [ 24 ] Valés-Gómez M, Chisholm SE, Cassady-Cain RL, Roda-Navarro P, Reyburn HT. Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 5 ): 1546-1554.
- [ 25 ] Roda JM, Joshi T, Butchar JP, McAlees JW, Lehman A, Tridandapani S, et al. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 21 ): 6419-6428.
- [ 26 ] 黄宇贤, 郭坤元, 王 杨, 陈锦章, 宋朝阳. 苹果酸舒尼替尼诱导高表达三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 的耐药鼻咽癌细胞高表达 NKG2D 配体 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 4 ): 311-315.
- [ 27 ] 黄宇贤, 王 杨, 胡亮杉, 宋朝阳, 郭坤元. 硼替佐米诱导 ABCG2<sup>high</sup> 耐药鼻咽癌细胞高表达 NKG2D 配体的实验研究 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2008, 38( 11 ): 1100-1104.
- [ 28 ] 黄宇贤, 王 杨, 崔 斐, 崔彦芝, 吴秉毅, 郭坤元. 索拉非尼诱导高表达三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 的鼻咽癌细胞杀伤敏感性的影响的研究 [ J ]. *解放军医学杂志*, 2009, 34( 1 ): 65-68.
- [ 29 ] 黄宇贤, 王 杨, 孙 明, 周雪云, 邓 兰, 郭坤元. 苦参碱对高表达 ABCG2 人耐药鼻咽癌细胞 NKG2D 配体表达的诱导作用 [ J ]. *中国肿瘤临床*, 2009, 36( 5 ): 266-270.
- [ 30 ] Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody - dependent cellular cytotoxicity against EGFR - expressing esophageal squamous cell carcinoma [ J ]. *Int J Cancer*, 2007, 120( 4 ): 781-787.
- [ 31 ] Nakamura Y, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Yoshikawa M, Itoh A, et al. Gefitinib ( Iressa ZD1839 ), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein ABCG2-mediated drug resistance [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 4 ): 1541-1546.
- [ 32 ] Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, et al. Erlotinib ( tarceva, OSI-774 ) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 22 ): 11012-11020.
- [ 33 ] Dai CL, Tiwari AK, Wu CP, Su XD, Wang SR, Liu DG, et al. Lapatinib ( tykerb, GW572016 ) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2 [ J ]. 2008, 68( 19 ): 7905-7914.
- [ 34 ] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, Karimi M, Baker J, Gall JM, et al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: A preclinical study [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12( 6 ): 1859-1867.
- [ 35 ] McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, et al. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2009; 15( 22 ): 6993-7002.
- [ 36 ] Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D [ J ]. *Immunology*, 2007, 121( 4 ): 439-447.
- [ 37 ] Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 8 ): 3959-3962.
- [ 38 ] Weizman N, Shiloh Y, Barzilai A. Contribution of the Atm protein to maintaining cellular homeostasis evidenced by continuous activation of the AP-1 pathway in Atm-deficient brains [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278( 9 ): 6741-6747.
- [ 39 ] Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression [ J ]. *Hum Immunol*, 2006, 67( 3 ): 159-169.
- [ 40 ] Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, et al. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 9 ): 5583-5590.
- [ 41 ] Carboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to antologous NK cell lysis [ J ]. *Blood*, 2007, 110( 2 ): 606-615.
- [ 42 ] Ogbomo H, Michaelis M, Klassert D, Doerr HW, Cinalt J Jr. Resistance to cytarabine induces the up-regulation of NKG2D ligands and enhances natural killer cell lysis of leukemic cells [ J ]. *Neoplasia*, 2008, 10( 12 ): 1402-1410.
- [ 43 ] Schatton T, Frank MH. Antitumor immunity and cancer stem cells [ J ]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 9( 1176 ): 154-169.
- [ 44 ] Jiang CC, Lucas K, Avery-Kiejda KA, Wade M, deBock CE, Thorne RF, et al. Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 16 ): 6708-6717.
- [ 45 ] Hersey P, Zhang XD. Treatment combinations targeting apoptosis to improve immunotherapy of melanoma [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 58( 11 ): 1749-1759.
- [ 46 ] Cirone P, Bourgeois JM, Shen F, Chang PL. Combined immunotherapy and antiangiogenic therapy of cancer with microencapsulated cells [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15( 10 ): 945-959.
- [ 47 ] Halama N, Zoering I, Jaeger D. Advanced malignant melanoma: Immunologic and multimodal therapeutic strategies [ J ]. *J Oncol*, 2010, 689( 893 ): 1-8.

[ 收稿日期 ] 2010 - 04 - 12

[ 修回日期 ] 2010 - 05 - 20

[ 本文编辑 ] 徐红梅