

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.019

## TIL 肿瘤过继细胞治疗研究进展

### Progress of TIL in tumor adoptive cell therapy

陈晚华<sup>1</sup>综述;刘辉<sup>1</sup>,汪毕<sup>2</sup>,钱其军<sup>1,2</sup>审阅(1. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 基因-病毒治疗实验室,上海 200438; 2. 苏州大学 医学部基础医学与生物科学学院,江苏 苏州 215123)

**[摘要]** 肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)是从肿瘤组织中分离出的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞,在体外经白介素 2(interleukin-2, IL-2)的刺激、活化、扩增后可应用于临床肿瘤过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)。为避免 IL-2 在扩增中的大量使用使得 TIL 中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 数量增加所产生的免疫耐受现象,现在研究集中于改进 TIL 的体外扩增方法;研究显示,“年轻”型 TIL(young TIL)靶向肿瘤的特异性更高,故其是潜在的扩增对象。临床使用 TIL 过继治疗前需对肿瘤患者进行全身放疗处理;TIL 过继治疗联合化疗药物(如环磷酰胺,氟达拉滨等)对自体淋巴清除(lymphodepletion)的肿瘤患者疗效显著,将成为以后肿瘤免疫治疗的主要方向;除化疗药物外,还可开发肿瘤疫苗、单克隆抗体等联合 TIL 过继治疗。本文主要介绍 TIL 培养体系、功能改进的研究以及 TIL 过继治疗联合化疗药物在临床恶性肿瘤治疗中的应用,讨论其可能存在的问题并展望未来的发展方向。

**[关键词]** TIL;体外扩增;过继治疗;化学免疫治疗

**[中图分类号]** R730.51; R391.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)06-0668-05

肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)最初是从肿瘤组织中发现的肿瘤抗原特异性 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞群,其中,CD8<sup>+</sup> T 细胞具有肿瘤杀伤作用。TIL 在体内的抑瘤作用受 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 的限制,在体外经 IL-2 的刺激作用后可恢复肿瘤杀伤活性,扩增后可应用于临床肿瘤过继细胞治疗。过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)指自体免疫细胞进行体外激活和扩增至一定数量后回输至肿瘤患者体内,在体内发挥杀伤肿瘤细胞作用的治疗方法。过继治疗需要回输的 TIL 的数量高达  $1 \times 10^{11}$  数量级。TIL 的体外扩增需要高剂量的 IL-2,但 IL-2 用量过高可导致培养的 TIL 中 Treg 数量的增加,从而产生免疫抑制。TIL 体外扩增的培养体系在减少 IL-2 剂量或使用 IL-2 替代物上有很大改进,如 IL-7、IL-15 的使用,饲养细胞与 TIL 混合培养刺激有杀伤活性的 TIL 扩增,“年轻”型 TIL(young TIL)在抗瘤作用中特异性更高。也有很多研究集中于改进 TIL 的功能,如将特异性 TCR(T cell receptor)基因、细胞因子基因、肿瘤趋化因子基因转入 TIL,或改造 TCR 使 TIL 细胞表达嵌合型抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)。临床上进行 TIL 过继治疗之前,需要对患者进行全身放疗,使患者体内的淋巴细胞清除(lymphodepletion),同时联合化疗药治疗可提高疗效。除化疗药外,肿瘤疫苗、单克隆抗体、细胞因子等也可与 TIL

过继治疗联合使用,因此联合治疗策略在临床治疗恶性肿瘤、改善患者预后具有重要意义。本文主要介绍 TIL 体外扩增体系的改进、TIL 过继治疗与放疗在临床的联合应用,讨论其可能存在的问题,并展望未来 TIL 肿瘤过继治疗的发展方向。

### 1 TIL 的研究历史

TIL 是一类肿瘤浸润性且具有抗原效应的细胞群,由 Rosenberg 等<sup>[1]</sup>于 1986 年从荷瘤小鼠肿瘤组织中发现并分离。TIL 以 T 细胞为主,同时包含 B 细胞和 NK 细胞。表型上主要是 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞,其中 CD8<sup>+</sup> T 细胞具有肿瘤杀伤作用,故 CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量决定其杀伤靶细胞的效率。TIL 中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞是一种起免疫抑制作用的调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg),Unitt 等<sup>[2]</sup>发现,在肝癌 TIL 中,Treg 的比例为 8.9%,而在正常组织中的比例则为 2.4%。

TIL 的抗肿瘤机制主要包括以下 3 种途径:(1)

**[基金项目]** 国家杰出青年科学基金资助项目(No. 30925037)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China for Distinguished Young Scholars (No. 30925037)

**[作者简介]** 陈晚华(1987-),女,山东省枣庄市人,硕士,主要从事肝癌的细胞-基因治疗方面的研究。E-mail: awan521@163.com

**[通信作者]** 钱其军(QIAN Qi-jun, corresponding author), E-mail: qianqj@163.com

TIL 中的 T 细胞在 TCR 和 CD28 提供的双刺激信号下转变为效应 T 细胞,直接杀伤肿瘤细胞或分泌干扰素等因子杀伤肿瘤细胞;(2) T 细胞通过其表面的 Fas 与肿瘤细胞表面的 FasL 结合,通过细胞内信号转导诱导靶细胞凋亡;(3) 在  $Ca^{2+}$  存在下,靶细胞表面可形成多聚穿孔素“孔道”,通过渗透压改变或与颗粒酶协同作用,引发靶细胞溶解或凋亡。

TIL 自发现后,在一些肿瘤治疗中取得了显著成效,有望成为新型肿瘤生物治疗方法。越来越多的研究集中于 TIL 的分离、培养、扩增及应用,使 TIL 研究进展非常迅速。

## 2 TIL 培养体系以及功能的改进

TIL 主要通过组织块培养、酶消化、机械解离、细针抽吸等 4 种方法获得。初次从肿瘤组织分离得到的 TIL 其免疫功能处于抑制状态,加入 IL-2 后其免疫功能得到显著提高,但此时的 TIL 并不能满足临床有效治疗所需的免疫细胞数量。因此,需要对其进行体外快速扩增,TIL 的体外扩增需加入高剂量 IL-2 ( $7\ 200\ IU/ml$ )<sup>[3,4]</sup>。IL-2 最初作为化疗药用于肿瘤患者的术后切除治疗,IL-2 半衰期短,故需要连续频繁给药,但高剂量 IL-2 会对患者产生毒性作用,如呕吐、发热及炎症反应,现已很少单独使用。为避免此类情况发生,Yamaue 等<sup>[5]</sup>研究发现,将 IL-2 基因转入 TIL,使其自身表达 IL-2。但 Wolf 等<sup>[6]</sup>研究发现,IL-2 可刺激 TIL 中  $CD4^+ CD25^+ Treg$  的增殖,Treg 通过细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 引发的免疫抑制作用降低了  $CD8^+ T$  细胞的肿瘤杀伤作用,因此 TIL 体外快速扩增培养体系需进行很大的改进。

### 2.1 TIL 体外扩增培养体系的改进

TIL 体外扩增培养体系在 IL-2 的使用方面有很大改进。研究<sup>[7]</sup>发现,与  $200\ IU/ml$  IL-2 相比,向体系中加入 IL-15、IL-7 各  $5\ ng/ml$  就可得到相同扩增倍数和体外功能的 TIL。IL-15 与 IL-7 既能够刺激 T 淋巴细胞的体外增殖,又能够维持中枢记忆性  $CD8^+ T$  细胞的干性,使其表型维持  $CD45RA-CD62L^+$ ,并减少  $CD4^+ CD25^+ Treg$  的数量。Isakov 等<sup>[8]</sup>研究发现,IL-15 与 IL-7 可促进  $CD8^+ T$  细胞产生 IFN- $\gamma$ ,对肿瘤细胞起到直接杀伤作用。因此,IL-15 与 IL-7 联合使用可代替高剂量 IL-2 应用于 TIL 的体外扩增。

研究<sup>[9]</sup>发现,黑色素瘤 TIL 扩增培养体系中加入抗 CD3 抗体(anti-CD3 monoclonal antibody, OKT3)

和饲养细胞(feeder)后可显著提高 TIL 扩增倍数。OKT3 可刺激 T 细胞的增殖信号,饲养细胞对 T 细胞起到外源刺激的作用。研究<sup>[10]</sup>尝试用树突状细胞作为饲养细胞,与 TIL 共培养扩增 TIL,由于树突状细胞数量、生存时间有限,故 TIL 的扩增倍数受到限制。研究<sup>[11]</sup>发现,使用正常人 PBMC 作为饲养细胞与 TIL 共培养可将 TIL 扩增至  $1 \times 10^{11}$  数量级,且饲养细胞与 TIL 的比值为  $50 \sim 200$  时,扩增效果较好<sup>[12-14]</sup>。使用抗原肽冲击后的树突状细胞疫苗刺激外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),再与 TIL 的混合培养,可有效扩增  $CD8^+ T$  的数量,根据此原理利用封闭系统的生物反应器可体外大规模扩增 TIL。

体外培养的 TIL 细胞主要分为 2 种,“年轻”型 TIL 和标准型 TIL(standard TIL),其中“年轻”型 TIL 是指经 24 孔板独立传代培养获得的“年轻”TIL,其制备时间短,不需要进行抗原特异性检测,且对肿瘤细胞具有高效靶向性;标准型 TIL 是指常规方法得到的、从肿瘤组织中分离的“标准”TIL,其制备时间长,需要进行抗原特异性检测。近期研究<sup>[15-17]</sup>集中于扩增更多“年轻”型 TIL 应用于肿瘤治疗。研究<sup>[18]</sup>发现,通过修饰 T 细胞使其表达抗原特异性 TCR 或 CAR,对其进行体外扩增后用于肿瘤治疗效果显著。

### 2.2 TIL 功能的改造

肿瘤细胞通常缺失或下调 HLA 或 Fas 的表达,从而逃脱免疫系统的攻击。研究<sup>[19-20]</sup>发现,肿瘤组织中 TGF- $\beta$  和 IL-10 等的含量通常比正常组织中高,同时,IL-10 通过上调 TGF- $\beta$  的表达限制 TIL 的免疫功能。Abusamra 等<sup>[21]</sup>发现,IL-10 下调与肿瘤细胞直接接触的 T 细胞表达 IFN- $\gamma$ ;同时肿瘤细胞还可分泌促进 T 细胞凋亡的细胞因子。除肿瘤细胞的影响外,TIL 自身具有某些缺陷,如 TIL 中存在大量  $CD4^+ CD25^+ Treg$ ,可抑制 T 细胞增殖所需 IL-2、IFN- $\gamma$  等因子,其表面的 CTLA-4 可与 APC 表面 CD28-B7 分子家族中 B7 分子结合,阻断共刺激信号,抑制免疫反应;与此同时,肿瘤细胞自身也会表达 CD28-B7 分子家族中类似功能作用的分子,通过与 T 细胞表面的程序死亡配体(programmed cell death-1, PD-1)结合,诱导 T 细胞凋亡。

提高 TIL 杀伤功能的方法有两种,一为转基因,二为遗传修饰 TCR。研究<sup>[22-23]</sup>发现,克隆抗原特异性 TCR 基因,通过病毒转染使其在 TIL 表面高表达,可有效提高其识别和杀伤肿瘤细胞的能力。如将 IFN- $\alpha$  基因转入 TIL 治疗黑色素瘤。或者通过遗传

修饰 TCR, 将 T 细胞表面 TCR 改造成 CAR。CAR 上包括肿瘤抗原识别信号, 抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)介导的共刺激信号以及 T 细胞增殖信号, 这种 CAR 不但能够高效靶向肿瘤细胞, 还可以使其自身不断增殖<sup>[18, 24-26]</sup>。现在很多研究者使用病毒载体携带识别肿瘤抗原的 TCR 基因, 如 MART1<sup>[27]</sup>、NY-ESO-1<sup>[28]</sup>等, 或用抗体 Fc 段基因改造的 CAR 转染 TIL, 使其表达抗原特异性的 TCR, 高效特异性杀伤肿瘤细胞。CAR 现已有三代, 第一代 CAR 并不能延长 T 细胞的生存时间; 第二代 CAR 增加了共刺激信号如 CD28, 以刺激 T 细胞的增殖; 第三代 CAR 加入了更多共刺激信号, 如 4-1BB, OX40 等。CAR 可应用于临床治疗淋巴瘤, 研究<sup>[29]</sup>发现, 使用 CD19 特异性的 CAR 治疗淋巴瘤效果也很显著。近年研究<sup>[30]</sup>还发现, 活化受体 NKG2D (natural-killer group 2, NKG2D) 融入 CD3 $\zeta$  胞质区的 CAR 表达于 T 细胞表面, 能够介导促炎症因子的产生而起到杀伤人恶性黑色素瘤细胞的作用。另外, 在体外使用细胞因子等筛选出具有记忆性特性的 TIL, 并在体外进行扩增, 或使用药物筛选 TIL 中无用的细胞, 使 TIL 更有效地杀伤肿瘤。

### 3 TIL 的临床应用现状

过继细胞治疗相对于单纯放化疗法具有更高的生物安全性、稳定性、疗效持久性等优点。自 1986 年 Rosenberg 利用 TIL 对荷瘤小鼠进行治疗发现其疗效是淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine-activated killer, LAK)疗效的 50 ~ 100 倍后, TIL 应用于临床抗肿瘤已成为研究的热点, 且已进入临床阶段。TIL 首次治疗 20 例转移性黑色素瘤, 取得了较好的疗效。根据全球知名临床试验网站的查询结果, 正在开展的 TIL 的临床试验已有 79 例, 其中 I 期临床试验 23 例, II 期 32 例, III、IV 期各 5 例, 临床试验招募中的临床试验有 14 例, 这些临床试验治疗的对象包括恶性黑色素瘤、鼻咽癌、肝癌、乳腺癌、皮肤癌、淋巴瘤等。

#### 3.1 TIL 过继治疗肿瘤

研究<sup>[31]</sup>发现, 使用 TIL 过继治疗转移性黑色素瘤患者出现肿瘤消退现象。Tran 等<sup>[17]</sup>发现, 将体外扩增的 TIL 回输至转移性黑色素瘤患者可产生 51% 的客观反应, 而使用 IL-2 和达卡巴嗪治疗仅获得 12% 和 15% 的客观反应。研究<sup>[32]</sup>发现, 黑色素瘤的 TIL 过继治疗的总体客观反应率达 56%。Goff 等<sup>[33]</sup>研究发现, 对恶性黑色素瘤患者进行 TIL 治疗取得 49% ~ 72% 的客观疗效。另一研究<sup>[34]</sup>发现, 对肝癌等其他

肿瘤进行 TIL 过继细胞治疗效果并不明显, 肝癌中肿瘤浸润 CD8<sup>+</sup> T 细胞表达 PD-1, 导致肝癌患者的预后差, 并且 PD-1 表达与 Foxp3<sup>+</sup> Treg 浸润相关, 高密度的 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞是肝切除术后预后不良的指标。肿瘤组织中高表达的免疫抑制因子 IL-10 和转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) 可作用于 Treg 的 CTLA-4 途径, 产生免疫抑制。TIL 过继治疗肿瘤存在一定的局限, 应积极寻找方法以突破这一局限, 使 TIL 更广泛地有效地应用于临床。

#### 3.2 TIL 联合放、化疗治疗肿瘤

过继免疫治疗与放、化疗联合可能产生更好的效果。放化疗诱导产生的坏死或凋亡肿瘤细胞可被 APC 提呈给回输的免疫细胞, 进而产生抗肿瘤免疫应答。化疗和放疗能够杀死肿瘤细胞, 并释放肿瘤抗原, 可以清除患者体内的免疫抑制细胞, 而且可以使肠道细菌进入组织以释放 Toll 样受体, 诱导 DC 成熟, 提呈抗原, 这些因素使得回输的 TIL 在体内能够更好地发挥作用。单纯使用免疫治疗不能有效治疗进展期胰腺癌等恶性肿瘤, 在进行 TIL 过继治疗前需对肿瘤患者全身放射清除淋巴细胞(lymphodepletion), 同时在进行 TIL 治疗过程中需要辅以化疗药物的使用, 如环磷酰胺、氟达拉滨等。因此, 肿瘤过继细胞免疫治疗结合放、化疗可以有效地提高肿瘤的临床治疗效果。

Dudley 等<sup>[31]</sup>发现, 使用 TIL 过继治疗黑色素瘤, 同时对患者进行 2 Gy、12 Gy 的放射治疗, 可分别产生 52%、72% 的客观疗效; Wrzesinski 等<sup>[35]</sup>研究发现, 放射剂量由 5 Gy 增至 9 Gy 时, 进行 TIL 过继治疗并联合 IL-2 作用, TIL 杀伤肿瘤细胞的效率会随之提高。IL-2 可降低 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 的数量, 还可抑制性细胞因子的产生。使用吉西他滨联合过继免疫治疗可增强细胞毒性 T 淋巴细胞的杀伤活性, 同时可显著抑制 Treg 的数量。Mastrangelo 等<sup>[36]</sup>研究发现, TIL 过继免疫治疗与环磷酰胺化疗在肿瘤治疗中起协同作用, 环磷酰胺可抑制 CD4<sup>+</sup> Treg 细胞的增殖, 但并不抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞的肿瘤杀伤活性; 同时, 使用自体 TIL 联合环磷酰胺治疗可显著提高实体瘤或恶性淋巴瘤的疗效, 且产生的毒性作用较少。

#### 3.3 TIL 过继细胞治疗面临的问题

目前, TIL 临床过继细胞治疗中仍然存在一些问题: (1) 回输的 TIL 经血液循环后存在数量较少。研究<sup>[37]</sup>发现, TIL 回输到患者体内经血液循环后仅为原来的 0.01%, 这将导致 TIL 在体外扩增的时间和数量都要延长; (2) 现在回输的 TIL 还无法完全去除 Treg。裸鼠 TIL 的过继细胞治疗研究<sup>[38]</sup>发现,

大量扩增 TIL 对经过全身辐照的荷瘤小鼠进行过继细胞治疗,结果却并未出现肿瘤消退的现象,这一现象提示,除了裸鼠自身免疫细胞外,TIL 本身存在抑制肿瘤消退的细胞成分,这些起到抑制作用的细胞主要是 Treg。因此在免疫治疗前需排除 Treg 等不利于 TIL 回输的因素;(3)TIL 过继治疗联合化疗与单独化疗等相比,虽一定程度上提高了疗效,但需更高昂的医疗费用,制约了其在肿瘤治疗中的普及。

#### 4 展 望

未来,TIL 过继治疗与手术、放化疗等传统治疗方法联合,将成为肿瘤治疗的发展趋势,与此同时也需要兼顾研发更有效的药物与之联合应用,如肿瘤疫苗、单克隆抗体等。FDA 批准的第一个免疫细胞相关肿瘤疫苗 Provenge 的上市,其在前列腺癌治疗中获得了显著成效<sup>[39]</sup>。TIL 过继细胞治疗联合肿瘤疫苗治疗将成为新型的治疗方案,抗 CD25、CTLA-4 抗体和抗 TNF- $\alpha$  受体的单克隆抗体可靶向清除 Treg,解除免疫抑制作用<sup>[40]</sup>。其中 Ipilimumab 是一种靶向 CTLA-4 的单克隆抗体,可解除 Treg 的免疫抑制作用,现已进入 III 期临床试验阶段<sup>[41-42]</sup>。寻找更多的用于肿瘤免疫治疗的分子靶标,开发更多具有增强免疫作用的单克隆抗体对肿瘤免疫治疗具有重大意义,目前候选的分子靶标包括 PD-1<sup>[43]</sup>、4-1BB<sup>[44]</sup>、X40<sup>[45]</sup>和 LAG-3<sup>[46]</sup>。

肿瘤的 TIL 免疫治疗在一些恶性肿瘤中取得了显著成效,因其靶向性高、特异性强、毒性作用小、疗效显著等优势已成为一种有效的新型免疫治疗方法。同时,TIL 免疫治疗与放化疗在肿瘤治疗中起到协同作用。另外,化疗除了用于晚期转移性肿瘤患者的治疗,也可治疗早期诊断的肿瘤患者。在临床应用过程中,应根据患者的具体情况来制定治疗方案。随着一些关键技术的突破,免疫治疗必将成为肿瘤治疗的重要组成部分。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes [ J ]. *Science*, 1986, 233( 4770 ): 1318-1319.

[ 2 ] Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: The role of T-regulatory cells [ J ]. *Hepatology*, 2005, 41( 4 ): 722-730.

[ 3 ] Sherry R, Rosenberg S, Yang J. Relapse after response to interleukin-2-based immunotherapy: Patterns of progression and response to retreatment [ J ]. *J Immunother*, 1991, 10( 5 ): 371-375.

[ 4 ] Aebersold P, Hyatt C, Johnson S, et al. Lysis of autologous mel-

noma cells by tumor infiltrating lymphocytes: Association with clinical response [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 1991, 83( 13 ): 932-937.

[ 5 ] Yamaue H, Kashmiri SV, De Filippi R, et al. Enhanced interleukin-2 production in human tumor-infiltrating lymphocytes engineered by 3'-truncated interleukin-2 gene [ J ]. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1994, 16( 4 ): 262-274.

[ 6 ] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9( 2 ): 606-612.

[ 7 ] Kaneko S, Mastaglio S, Bondanza A, et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes [ J ]. *Blood*, 2009, 113( 5 ): 1006-1015.

[ 8 ] Isakov D, Dzutsev A, Berzofsky JA, et al. Lack of IL-7 and IL-15 signaling affects interferon-gamma production by, more than survival of, small intestinal intraepithelial memory CD8<sup>+</sup> T cells [ J ]. *Eur J Immunol*, 2011, 41( 12 ): 3513-3528.

[ 9 ] Itzhaki O, Hovav E, Ziporen Y, et al. Establishment and large-scale expansion of minimally cultured "young" tumor infiltrating lymphocytes for adoptive transfer therapy [ J ]. *J Immunother*, 2011, 34( 2 ): 212-220.

[ 10 ] Li Y, Liu S, Campbell R, et al. Maintenance of CD27<sup>+</sup> effector memory T cells during *ex vivo* expansion of melanoma TIL is critical for adoptive T-cell therapy [ J ]. *J Immunother*, 2006, 29( 6 ): 630-631.

[ 11 ] Labarriere N, Gervois N, Bonnin A, et al. PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting [ J ]. *Cancer Immunol Immun*, 2008, 57( 2 ): 185-195.

[ 12 ] Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients [ J ]. *J Immunother*, 2003, 26( 4 ): 332-342.

[ 13 ] Klapper JA, Thomasian AA, Smith DM, et al. Single-pass, closed-system rapid expansion of lymphocyte cultures for adoptive cell therapy [ J ]. *J Immunol Methods*, 2009, 345( 1/2 ): 90-99.

[ 14 ] Zuliani T, David J, Bercegeay S, et al. Value of large scale expansion of tumor infiltrating lymphocytes in a compartmentalised gas-permeable bag: Interests for adoptive immunotherapy [ J ]. *J Transl Med*, 2011, 9: 63-64.

[ 15 ] Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16( 9 ): 2646-2647.

[ 16 ] Ye Q, Loisiou M, Levine BL, et al. Engineered artificial antigen presenting cells facilitate direct and efficient expansion of tumor infiltrating lymphocytes [ J ]. *J Transl Med*, 2011, 9: 131-144.

[ 17 ] Tran KQ, Zhou J, Durlinger KH, et al. Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy [ J ]. *J Immunother*, 2008, 31( 8 ): 742-751.

[ 18 ] Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells [ J ]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29( 11 ):

- 550-557.
- [ 19 ] Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MS, et al. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction – A comparative study of human clinical-applicable DC [ J ]. *Clin Immunol*, 2012, 142( 3 ): 332-342.
- [ 20 ] Anzai A, Anzai T, Nagai S, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling [ J ]. *Circulation*, 2012, 125( 10 ): 1234-1245.
- [ 21 ] Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8<sup>+</sup> T-cell apoptosis [ J ]. *Blood Mol Dis*, 2005, 35( 2 ): 169-173.
- [ 22 ] Jones S, Peng PD, Yang S, et al. Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20( 6 ): 630-640.
- [ 23 ] Cohen CJ, Zheng Z, Bray R, et al. Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR [ J ]. *J Immuno*, 2005, 175( 9 ): 5799-5800.
- [ 24 ] Junker N, Kvistborg P, Kollgaard T, et al. Tumor associated antigen specific T-cell populations identified in ex vivo expanded TIL cultures [ J ]. *Cell Immunol*, 2012, 273( 1 ): 1-9.
- [ 25 ] Burns WR, Zhao Y, Frankel TL, et al. A high molecular weight melanoma-associated antigen-specific chimeric antigen receptor re-directs lymphocytes to target human melanomas [ J ]. *Cancer Res*, 2010, 70( 8 ): 3027-3033.
- [ 26 ] Voutsas IF, Gritzapis AD, Mahaira LG, et al. Induction of potent CD4<sup>+</sup> T cell-mediated antitumor responses by a helper HER-2/neu peptide linked to the Ii-Key moiety of the invariant chain [ J ]. *Int J Cancer*, 2007, 121( 9 ): 2031-2041.
- [ 27 ] Li Y, Liu S, Hernandez J, et al. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro [ J ]. *J Immunol*, 2010, 184( 1 ): 452-465.
- [ 28 ] Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 [ J ]. *J Clin Oncol*, 2011, 29( 7 ): 917-924.
- [ 29 ] Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: Case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial [ J ]. *Molecular Ther*, 2010, 18( 4 ): 666-667.
- [ 30 ] Barber A, Meehan K, Sentman C. Treatment of multiple myeloma with adoptively transferred chimeric NKG2D receptor-expressing T cells [ J ]. *Gene Ther*, 2011, 18( 5 ): 509-516.
- [ 31 ] Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: Evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens [ J ]. *J Clin Oncol*, 2008, 26( 32 ): 5233-5239.
- [ 32 ] Peyton J, Spigel D, Burris H, et al. Phase II trial of bevacizumab and everolimus in the treatment of patients with metastatic melanoma: Preliminary results [ J ]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 9027-9028.
- [ 33 ] Goff SL, Smith FO, Klapper JA, et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: Analysis of tumors resected for TIL [ J ]. *J Immunother*, 2010, 33( 8 ): 840-841.
- [ 34 ] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 3 ): 902-911.
- [ 35 ] Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells [ J ]. *J Immunother*, 2010, 33( 1 ): 1-7.
- [ 36 ] Mastrangelo MJ, Berd D, Maguire H, Jr. The immunoenhancing effects of cancer chemotherapeutic agents [ J ]. *Semin Oncol*, 1986, 13( 2 ): 186-194.
- [ 37 ] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction [ J ]. *New Engl J Med*, 1990, 323( 9 ): 570-578.
- [ 38 ] Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, et al. CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells [ J ]. *J Immuno*, 2005, 174( 5 ): 2591-2592.
- [ 39 ] Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (provenge) injection: The first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer [ J ]. *Pharm Ther*, 2011, 36( 4 ): 197-202.
- [ 40 ] Golovina TN, Vonderheide RH. Regulatory T cells: Overcoming suppression of T-cell immunity [ J ]. *Cancer J*, 2010, 16( 4 ): 342-347.
- [ 41 ] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma [ J ]. *N Engl J Med*, 2010, 363( 8 ): 711-723.
- [ 42 ] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 364( 26 ): 2517-2526.
- [ 43 ] Shi F, Shi M, Zeng Z, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8<sup>+</sup> T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients [ J ]. *Int J Cancer*, 2011, 128( 4 ): 887-896.
- [ 44 ] Li Q, Ai J, Song Z, et al. 4-1BB( CD137 ) ligand enhanced anti-tumor immune response against mouse forestomach carcinoma *in vivo* [ J ]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5( 5 ): 379-384.
- [ 45 ] Kasahara S, Clark EA. Dendritic cell-associated lectin 2 ( DCAL2 ) defines a distinct CD8 $\alpha$ - dendritic cell subset [ J ]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91( 3 ): 437-448.
- [ 46 ] Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice [ J ]. *J Exp Med*, 2011, 208( 2 ): 395-407.

[ 收稿日期 ] 2012 - 06 - 07

[ 修回日期 ] 2012 - 09 - 24

[ 本文编辑 ] 周玲琳