

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.012

· 临床研究 ·

鼻咽癌患者外周血共刺激分子的表达水平及其临床意义

陈传本^{1,2}, 黄超雄¹, 黄丽洁^{1,2,3}, 郑秋红^{1,2,3} (1. 福建医科大学省立临床医学院, 福建 福州 350004; 2. 福建省肿瘤医院, 福建 福州 350014; 3. 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:**检测鼻咽癌患者外周血中T细胞表面程序性死亡分子1(programmed death-1, PD-1)、刺激分子4-1BB的表达水平,探讨其在鼻咽癌中的临床意义。**方法:**选取2016年10至11月福建省肿瘤医院病理确诊的鼻咽癌患者30例作为研究对象,并选取同期本院体检中心性别、年龄相近的健康体检者30例作为对照组。通过流式细胞术检测外周血T细胞表面PD-1、4-1BB的表达情况以及T淋巴细胞亚群的比例。核磁共振扫描测量原发肿瘤体积。**结果:**鼻咽癌III期患者外周血CD8⁺T细胞比例明显低于IV期患者[(13.1±6.2)% vs (18.7±5.5)%, $P<0.05$]。与对照组相比,CD4⁺T细胞上PD-1阳性表达率显著上调[(8.7±6.5)% vs (3.87±3.0)%, $P<0.05$]。鼻咽癌患者外周血T细胞PD-1、4-1BB分子表达水平与临床分期、肿瘤负荷、性别及年龄无显著相关($P>0.05$)。**结论:**鼻咽癌患者外周血PD-1和4-1BB两种共刺激分子在患者体内肿瘤免疫逃逸中可能存在协同效应。联合干预这两种共刺激分子的信号通路可能具有更高效持久的抗肿瘤效应,可为鼻咽癌免疫治疗提供新的思路。

[关键词] 鼻咽癌;共刺激分子;外周血;T细胞

[中图分类号] R739.63; R73-3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0767-06

Expression level of costimulatory molecules in peripheral blood of the patients with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance

CHEN Chuanben^{1,2}, HUANG Chaoxiong¹, HUANG Lijie^{1,2,3}, ZHENG QiuHong^{1,2,3} (1. Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China; 2. Cancer Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. Key Laboratory of Tumor Biotherapy of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To test expression levels of programmed death-1(PD-1) and costimulatory 4-1BB molecules on surface of T cells in peripheral blood of the patients with nasopharyngeal carcinoma and to explore their clinical significance in immunotherapy of the patients with nasopharyngeal carcinoma. **Methods:** Thirty patients with nasopharyngeal carcinoma who were pathological diagnosed and hospitalized in Cancer Hospital of Fujian Province during October to November 2016 were selected as objects of the research, and 30 healthy individuals who are similar to the research objects in gender and age and took physical examination in a medical examination center of the same hospital during the same period as a control group. Expressions of PD-1 and 4-1BB on surface of T cells in peripheral blood as well as ratio of T lymphocyte subgroups were detected by a flow cytometry assay. Using nuclear magnetic resonance scanning, volumes of the primary carcinoma were measured. **Results:** Ratio of CD8⁺T cell in peripheral blood of the patients with III stage of nasopharyngeal carcinoma was obviously lower than that of the patients with IV stage of nasopharyngeal carcinoma ([13.1±6.2]% vs [18.7±5.5]%, $P<0.05$). Comparing with the control group, positive expression rate of PD-1 on CD4⁺T cell in the research group was sig-

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. 2015J01380), 国家临床重点专科建设资助项目(2013), 福建省临床重点专科建设资助项目(2012)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province(No. 2015J01380), the National Key Clinical Specialty Discipline Construction Foundation of China (2013), and the Key Clinical Specialty Discipline Construction Foundation of Fujian Province(2012)

[作者简介] 陈传本(1964-),男,学士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤放射治疗研究,E-mail: ccbben@126.com

[通信作者] 陈传本(CHEN Chuanben, corresponding author)

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170707.1519.016.html>

nificantly up-regulated([8.7±6.5]% vs [3.87±3.0] %, $P<0.05$). Expression levels of PD-1 and 4-1BB on surface of T cells in peripheral blood of the patients with nasopharyngeal carcinoma did not obviously correlated with clinical staging, tumor load, gender and age of the patient ($P>0.05$). **Conclusion:** There could be a synergistic effect between the two costimulatory molecules, PD-1 and 4-1BB, in an immune escape process of tumor. Joint intervening a signaling pathway of these two co-stimulation molecules might have more effective and durable antitumor effects, which might provide a novel ideal for an immunotherapy of the nasopharyngeal carcinoma.

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; costimulatory molecules; peripheral blood; T cell

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 767-772. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.012]

随着联合放化疗以及调强放疗技术在临床的应用,鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)患者的5年生存率已有大幅度提高,但进一步提高鼻咽癌患者的生存率仍有一定难度。鼻咽癌治疗失败的重要因素是远处转移或局部复发。如何降低远处转移和提高局部控制率成为当前国内外学者研究的焦点之一。探索鼻咽癌治疗失败的潜在原因或许可开拓T细胞免疫治疗肿瘤的新途径。近年来,在肿瘤和免疫领域的最新研究^[1]表明,肿瘤细胞可通过免疫逃逸机制成功躲避免疫系统的进攻和清除。其中,T细胞介导的免疫应答在免疫逃逸,特别是控制肿瘤细胞的生长、转移和复发中发挥重要作用^[2-4]。具体来说,T细胞活化需要两种活化信号的协同作用,分别是抗原提呈信号和协同刺激信号。作为T淋巴细胞和肿瘤抗原识别过程的共刺激分子正是通过提供正负调节信号,精细调控T淋巴细胞的免疫应答。如果共刺激分子正调节作用太弱或负调节作用过强,可能导致T淋巴细胞的活化、增殖等功能障碍,从而影响机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤。肿瘤逃逸机制的相关研究^[5-7]发现,肺癌、乳腺癌和胃癌等恶性肿瘤患者外周血中T细胞表面共抑制分子的过表达,是肿瘤细胞逃避机体免疫监视与杀伤的重要途径之一。关于鼻咽癌患者外周血T细胞上共刺激分子的表达情况及其与鼻咽癌诸多临床特征的相关性,目前尚不清楚。为明确这些共刺激分子的诊断及预后价值,本研究采用流式细胞术检测鼻咽癌患者及健康人外周血T细胞PD-1和4-1BB两种共刺激分子的表达水平,并探讨其在鼻咽癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2016年10至11月在福建省肿瘤医院病理确诊的鼻咽癌患者30例,患者各项临床特征见表1。鼻咽癌患者入组标准:年龄16~68岁;卡氏评分大于80分;病理确诊为鼻咽癌;未经任何治疗的首诊患

者;无心、肝、肾、消化道和代谢异常,无神经系统疾病史;无自身免疫性疾病。对照组为性别、年龄相近的同期本院体检中心健康体检者30例,健康个体入组标准:年龄在24岁到65岁之间;身体健康,无心、肝、肾、消化道和代谢异常及神经系统疾病史;无自身免疫性疾病。本研究经福建省肿瘤医院伦理委员会批准,所有入组对象均知情同意并签署书面知情同意书。

表1 研究对象的临床特征(n)

Tab. 1 Clinical characteristics of the subjects in the research(n)

	NPC Group	Control Group
Gender		
Male	18	17
Female	12	13
Age (t/a)		
≥50	17	16
<50	13	14
Clinical staging		
I / II / III / IV	0 / 1 / 11 / 18	Health individuals

1.2 主要试剂和仪器

异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的PD-1抗体购自美国Biolegend公司, FITC标记的4-1BB抗体购自美国Ebioscience公司, PC5标记的CD3抗体、PC7标记的CD4抗体、藻红蛋白-得克萨斯红(energy coupled dye, ECD)标记的CD8抗体均购自美国Beckman Coulter公司,上述抗体的IgG购自对应抗体同一公司。Cytomics FC 500流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.3 外周血采集和外周血单个核细胞(PBMC)的分离

所有研究对象于清晨空腹采血,EDTA-K2抗凝管采集静脉血标本,并立即置于4℃环境保存,6h内送检。采集的血标本在肝素抗凝管中摇匀,加入等

体积 D-PBS 稀释,移至装有 3 ml 淋巴细胞分离液的离心管中;700×g 离心 25 min 后用毛细吸管吸出,加入另一支离心管中;用 5 倍以上体积的 D-PBS 液洗涤 2 次得到 PBMC。

1.4 流式细胞术检测 T 细胞亚群表面 PD-1 及 4-1BB 的表达率

将分离出的 PBMC 平均分成 5 份,各用 100 μl D-PBS 重悬。1 号管为空白管,2 号管和 3 号管加入 PD-1、CD3、CD4、CD8 抗体及对应同型抗体各 10 μl,4 号管和 5 号管加入 4-1BB、CD3、CD4、CD8 抗体及对应同型抗体各 10 μl。室温避光孵育 30 min 后,分别加入 D-PBS 液 1 ml 重悬细胞,300×g 离心 3 min,洗涤 2 次;弃上清液,加入 300 μl 的 4% 多聚甲醛固定液重悬细胞,用 FC500 流式细胞仪检测 T 细胞亚群表面 PD-1 及 4-1BB 的表达率。

1.5 测量原发肿瘤和转移淋巴结体积

所有患者治疗前行核磁共振扫描。将扫描图像导入三维治疗计划系统,逐层勾画出肿瘤病变的轮廓,最后通过系统的三维重建计算出原发肿瘤体积和颈部转移淋巴结的体积。

1.6 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件分析数据,计量资料用

($\bar{x} \pm s$)表示,各组计量资料正态性检验用 *K-S* 检验 (Kolmogorov-Smirnov test),两组方差齐性检验用 *LEVENE* 检验,符合正态分布及方差齐的两组间比较用 *t* 检验。两组数据相关性分析,符合正态分布用 *Pearson* 检验,不符合正态分布用 *Spearman* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌 III 期患者外周血 CD8⁺T 淋巴细胞百分率显著低于 IV 期患者和健康个体

流式细胞术检测结果(表 2)可见,鼻咽癌组患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T、CD3⁺及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞亚群百分率与对照组健康个体差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。不同病理分期鼻咽癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群分析结果(表 3)显示,III 期患者外周血 CD8⁺T 细胞亚群百分率显著低于 IV 期患者 [(13.1±6.2)% vs (18.7±5.5)% , $P < 0.05$] 及对照组健康个体 [(13.1±6.2)% vs (18.4±5.0)% , $P < 0.01$]。IV 期患者外周血 T 淋巴细胞各亚群百分率与对照组健康个体差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CD4⁺T、CD3⁺及 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞亚群百分率与临床病理分期无显著相关 ($P > 0.05$)。

表 2 各组研究对象外周血 T 淋巴细胞亚群百分率 [$n=30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 2 Percentages of T lymphocyte subsets in peripheral blood of the subjects in various groups [$n=30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Group	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD3 ⁺	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
NPC	26.2±11.3	16.6±6.2	45.9±15.8	1.71±0.79
Control	28.8±7.6	18.4±5.0	51.9±9.3	1.72±0.80
<i>P</i>	0.302	0.242	0.081	0.993

表 3 不同分期鼻咽癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群百分率 [$n=30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 3 Percentages of the T lymphocyte subsets in peripheral blood of the patients with NPC at different staging [$n=30, (\bar{x} \pm s)\%$]

Stage	<i>N</i>	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD3 ⁺	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
III	11	24.4±12.3	13.1±6.2	41.4±19.7	1.96±0.78
IV	18	27.9±11.0	18.7±5.5	49.1±13.1	1.60±0.77
<i>P</i>		0.436	0.018	0.270	0.243

2.2 鼻咽癌患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞 PD-1 分子表达率显著升高

流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群 PD-1 分子表达结果(表 4)显示,鼻咽癌组外周血 CD4⁺T 细胞上 PD-1 的阳性表达率明显高于对照组 [(8.7±6.5)% vs (3.87±3.0)% , $P < 0.05$, 图 1A]。CD8⁺T 细胞上 PD-1 的阳性

表达率较对照组有上调的趋势,差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1B)。CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞上 PD-1 表达率 *pearson* 相关性分析结果显示两者呈显著正相关 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群 4-1BB 分子表达结果(表 5)可见,鼻咽癌组 CD8⁺T 细胞上 4-1BB 表达水平呈下调趋势,CD4⁺T 细胞上 4-1BB

表达水平呈上调趋势,但均无显著性意义($P>0.05$)。

2.3 鼻咽癌患者PD-1和4-1BB共刺激分子表达水平与临床特征无显著相关

相关性分析结果(表6)显示,鼻咽癌患者PD-1和4-1BB分子的表达水平与临床分期、性别、年龄均无显著相关($P>0.05$)。进一步分析临床不同期鼻咽癌患者外周血CD8⁺T细胞PD-1分子表达情况显示,T4期患者外周血CD8⁺T细胞PD-1分子表达较T2-3期患者呈上调趋势[(29.6±18.0)% vs (36.0±19.0)%],但无显著性差异($P>0.05$)。

表4 不同组T淋巴细胞亚群PD1阳性表达率[n=30,($\bar{x}\pm s$)%]
Tab. 4 Expression rates of PD-1 molecule on the T lymphocyte subsets in the various groups[n=30,($\bar{x}\pm s$)%]

Group	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD3 ⁺
NPC	8.7±6.5	32.4±18.4	10.6±7.2
Control	3.87±3.0	24.9±16.2	8.5±5.2
<i>P</i>	0.001	0.102	1.193

2.4 鼻咽癌患者PD-1分子的表达水平与原发肿瘤负荷无显著相关

PD-1分子表达水平与鼻咽癌原发肿瘤体积相关性分析结果(图2)显示,鼻咽癌组外周血CD4⁺T、CD8⁺T细胞PD-1表达水平与原发肿瘤体积(GTV-T)呈正相关趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。说明PD-1分子在CD4⁺T和CD8⁺T细胞表达水平与原发肿瘤体积无显著相关性。

表5 不同组T细胞淋巴细胞亚群4-1BB阳性表达率[n=30,($\bar{x}\pm s$)%]
Tab. 5 Expression rates of 4-1BB molecule on the T lymphocyte subsets in the various groups[n=30,($\bar{x}\pm s$)%]

Group	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD3 ⁺
NPC	5.1±3.5	9.8±9.5	4.1±3.5
Control	3.8±2.6	13.2±12.1	3.8±2.8
<i>P</i>	0.091	0.236	0.727

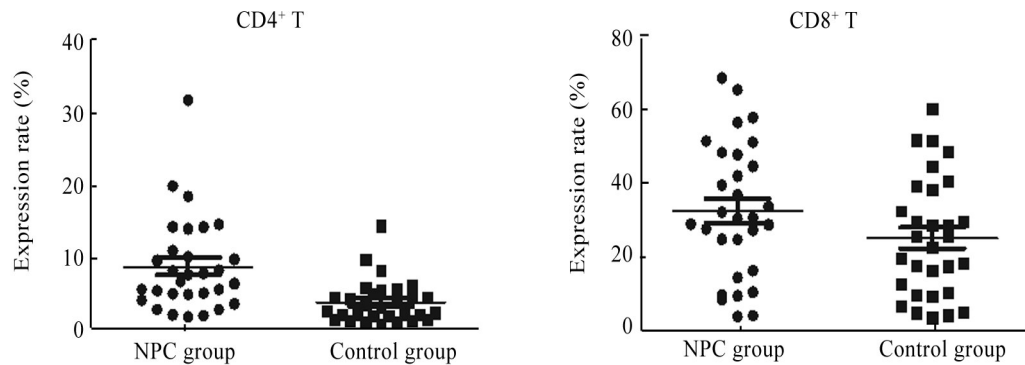


图1 PD-1在不同组CD4⁺、CD8⁺T细胞的表达

Fig. 1 Expressions of PD-1 molecule on the CD4⁺T and CD8⁺T lymphocytes in the various groups

表6 鼻咽癌患者PD-1和4-1BB分子表达水平与临床特征的相关性[r(P)]

Tab. 6 Correlation between expressions of PD-1, 4-1BB molecules and clinical characteristics of the patients with NPC [r(P)]

Clinical characteristics	PD-1 on CD4 ⁺ T	PD-1 on CD8 ⁺ T	4-1BB on CD4 ⁺ T	4-1BB on CD8 ⁺ T
Gender				
Male/Female	-0.259 (0.166)	-0.110 (0.563)	-0.334 (0.071)	-0.138 (0.468)
Age(t/a)				
>50/<50	-0.239 (0.203)	-0.052 (0.785)	0.048 (0.802)	0.135 (0.477)
Clinical staging				
I/II/III/IV	0.015 (0.937)	-0.007 (0.972)	0.092 (0.628)	-0.042 (0.826)

3 讨论

机体免疫系统可通过免疫监视机制特异性识别和摧毁突变细胞,防止进一步发展形成肿瘤。然而,部分肿瘤细胞可通过免疫逃逸机制免受机体防御系统的杀伤,在体内不断增殖导致肿瘤发展^[1]。T细胞作为免疫细胞,在共刺激分子精细调控下发挥抗肿瘤免疫作用。T淋巴细胞可进一步分为辅助T淋巴细胞(CD4⁺T淋巴细胞)和细胞毒T淋巴细胞(CD8⁺T

淋巴细胞),在抗肿瘤免疫应答中起关键作用^[9]。外周血T淋巴细胞亚群的比例情况是反映体内抗肿瘤免疫状态的关键指标之一^[10]。本研究发现,鼻咽癌III期患者的CD8⁺T淋巴细胞比例明显低于IV期鼻咽癌患者,提示III期鼻咽癌患者外周血细胞毒活性较IV期鼻咽癌患者显著降低,提示鼻咽癌患者存在免疫功能失衡现象,其结论还有待于扩大样本数后进一步分析。

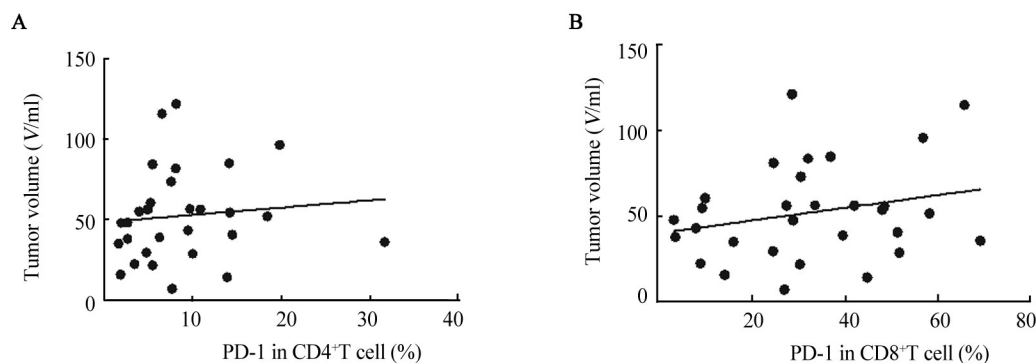


图2 CD4⁺和CD8⁺T细胞PD-1表达与原发肿瘤体积的相关性

Fig. 2 Correlation of expression rates of PD-1 molecule on CD4⁺ and CD8⁺ T cells with volume of the primary tumor (GTV-T)

共刺激分子PD-1和4-1BB参与T细胞免疫应答,在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用^[3-4, 7-8]。PD-1属于CD28家族成员,主要表达在CD4⁺和CD8⁺T细胞表面^[11-12]。研究^[13]显示非小细胞肺癌患者外周血CD4⁺T细胞PD-1的表达较健康对照组上调,且高表达与短期无病生存率相关,提示PD-1可能是一个潜在的判断预后指标。研究^[14]同样发现胃癌患者外周血CD4⁺T和CD8⁺T细胞PD-1同样存在高表达现象。然而,关于鼻咽癌患者外周血PD-1表达水平的相关研究目前尚未见报道。本研究发现鼻咽癌患者外周血CD4⁺T细胞PD-1表达较健康对照组显著上调,CD8⁺T细胞PD-1表达也高于对照组健康个体,但差异无统计学意义,与其他肿瘤的报道类似。此外,本研究还发现鼻咽癌患者外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞PD-1表达水平呈显著正相关,提示鼻咽癌患者体内CD8⁺T细胞增殖、分泌功能可能也受损。

共刺激分子4-1BB是肿瘤坏死因子/肿瘤坏死因子受体超家族成员,主要在活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞上表达^[5],具有强大的促进T细胞活化和增殖,减少凋亡和生成免疫记忆的功能,可能成为肿瘤免疫治疗中有潜力的治疗靶点^[16]。研究^[17]发现,4-1BB单抗的抗肿瘤效应取决于CD8⁺T细胞,而CD4⁺T细胞

主要在维持免疫记忆功能中发挥重要作用,并不是4-1BB相关的抗肿瘤免疫反应所必须的。本研究发现鼻咽癌患者外周血CD8⁺T细胞4-1BB的表达有下降趋势,提示鼻咽癌患者体内CD8⁺T细胞4-1BB表达可能下调。CD8⁺T细胞表面4-1BB表达下调不利于CD8⁺T淋巴细胞的活化、增殖及发挥抗肿瘤的效应,这种免疫状态失衡可能在鼻咽癌发生发展中发挥重要作用,但是仍需要扩大样本进一步证实。

本研究发现鼻咽癌患者外周血T细胞共刺激分子PD-1和4-1BB呈低表达趋势,而且外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞PD-1表达水平呈显著正相关,提示这两种调控分子在鼻咽癌患者体内可能存在协同效应,并在鼻咽癌免疫逃逸过程扮演重要角色。因此,单独阻断或激发某一信号通路的免疫调节作用有限,联合干预负性分子PD-1和正性分子4-1BB等信号通路可能具有更高效持久的抗肿瘤效应,这也为鼻咽癌免疫治疗提供新的思路。

本研究结果显示鼻咽癌患者外周血CD4⁺T、CD8⁺T细胞PD-1表达水平与原发肿瘤体积(GTV-T)呈正相关趋势,但无统计学意义,提示外周血PD-1表达水平与鼻咽癌原发肿瘤体积无显著相关。但是,本研究鼻咽癌患者样本量偏少,有待进一步扩大病

例规模分析共刺激分子表达与患者预后的关系。

[参考文献]

[1] DAWSON M A, KOUZARIDES T, HUNTLY B J. Targeting epigenetic readers in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(7): 647-657. DOI: 10.1056/NEJMra1112635.

[2] RIBAS A, KEFFORD R, MARSHALL M A, et al. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(5): 616-622. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.6112.

[3] ZITVOGEL L, KROEMER G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(8): 1223-1225. DOI: 10.4161/onci.21335.

[4] PEGGS K S, QUEZADA S A, ALLISON J P. Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy[J]. *Immunol Rev*, 2008, 224(1): 141-165. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00649.x.

[5] 韦腾飞, 张军, 吴豫, 等. CD4⁺T细胞表面共抑制分子的表达水平与非小细胞肺癌疾病进展的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2014, 36(6): 424-429. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2014.06.005.

[6] ERFANI N, MEHRABADI S M, GHAYUMI M A, et al. Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(2): 306-311. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.04.011.

[7] RIBAS A, KEFFORD R, MARSHALL M A, et al. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(5): 616-622. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.6112.

[8] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1027-1034. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027.

[9] IKEDA H, CHAMOTO K, TSUJI T, et al. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy[J]. *Cancer Sci*,

2004, 95(9): 697-703. DOI:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03248.x.

[10] KUSS I, HATHAWAY B, FERRIS R L, et al. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(11): 3755-3762. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0054.

[11] ANDREW M, MANVEER G, JARED J. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma[J]. *Arch Dermatol Res*, 2014, 306(6): 511-519. DOI: 10.1007/s00403-014-1457-7.

[12] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

[13] ZHENG H, LIU X, ZHANG J, et al. Expression of PD-1 on CD4⁺ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56233-56240. DOI: 10.18632/oncotarget.9316.

[14] SAITO H, KURODA H, MATSUNAGA T, et al. Increased PD-1 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(5): 517-522. DOI: 10.1002/jso.23281.

[15] KWON B S, HURTADO J C, LEE Z H, et al. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5483-5490. DOI: 10.4049/jimmunol.168.11.5483

[16] BARTKOWIAK T, CURRAN M A. 4-1BB agonists: multi-potent potentiators of tumor immunity[J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 117 [2017-04-26]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2015.00117/full>. DOI: 10.3389/fonc.2015.00117.

[17] MILLER R E, JONES J, LE T, et al. 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor specific immune responses by direct activation of CD8⁺ T cells in a CD4-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2002, 169(4): 1792-1800. DOI: 10.4049/jimmunol.169.4.1792.

[收稿日期] 2017-01-26

[修回日期] 2017-05-20

[本文编辑] 宋关鸿

· 读者·作者·编者·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》，文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方，均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字，如 20 世纪 90 年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等；年份不能用简称，“1998 年”不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字，如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求：5 万至 10 万应写成 5 万~10 万，不能写成 5~10 万； 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ，或 $(3 \sim 5) \times 10^9$ ，不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$ ；60% 至 70% 不能写成 60~70%，应写成 60% ~ 70%； 25.5 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 0.5) mg。(5) 带单位的量值相乘时，每个数值后单位不能省略，如 4 mm×2 mm×3 mm，不能写成 4×2×3 mm 或 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ 。

(本刊编辑部)