

免疫疗法抗膀胱癌的研究进展

刘春萍 曾 星

摘 要 膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一,具有发生术后复发率和病死率高的特点,临床上治疗方法以手术结合放化疗为主,但是不良反应大,复发率高。免疫系统是人体抵御病原菌的最重要保卫系统,担负着识别、清除肿瘤细胞,维持机体内环境稳定性的作用。近年来,免疫疗法在肿瘤治疗中取得了突破性进展。非特异性免疫治疗的方法包括了经典疗法 BCG 膀胱灌注、过继性细胞免疫治疗、免疫毒素、细胞因子、单克隆抗体、CAR-T 细胞治疗等方法;特异性免疫治疗主要指的是肿瘤疫苗治疗。免疫疗法由于具有高效、低不良反应的特点,近年来备受关注。未来的治疗方向趋向于精准化、个性化,不良反应小的免疫治疗。本文就免疫疗法抗膀胱癌的研究进展现状进行综述。

关键词 膀胱癌 免疫疗法 非特异性 特异性

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.004

膀胱癌是最常见的泌尿系统肿瘤,具有发生率高、术后复发率高和病死率高的特点。2003 年后,我国膀胱癌病死率呈现逐年增长趋势,至 2008 年,病死率达到 2.63/100000 的高峰,发生率跃居中国泌尿系统恶性肿瘤第 1 位^[1]。膀胱癌的治疗,主要以手术为主,结合放化疗,但是不良反应大,复发率高^[2]。免疫系统是人体抵御病原菌的最重要保卫系统,能够识别并清除外来入侵的抗原、体内发生突变的肿瘤细胞、衰老细胞、死亡细胞或其他有害的成分,维持自身机体内环境的稳定性。因而,提高患者机体免疫力是防治肿瘤的重要途径。随着近年来免疫治疗机制逐渐被阐述,通过免疫方法治疗膀胱癌成为研究的热点。本文就近年来免疫疗法抗膀胱癌的研究进展进行综述。

一、非特异性免疫治疗

1. 卡介苗:卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG)是由牛结核杆菌减毒制成的活菌苗,最早用于治疗结核病。直到 1976 年, Morales 等首次用 BCG 治疗膀胱癌,此后经过大量的实验研究及临床实践证实 BCG 膀胱腔灌注有预防术后复发,提高生存率及延长生存时间等作用,是一种有效的生物免疫疗法^[3]。研究发现 BCG 用于膀胱癌术后灌注,是基于对局部的非特异性免疫作用^[4,5]。BCG 抗膀胱癌的

作用主要分为启动阶段和效应阶段。BCG 与膀胱纤维黏连蛋白的结合,同时在肿瘤细胞中内在化是抗肿瘤作用的启动阶段。在 BCG 诱导下,肿瘤细胞表达肿瘤相关抗原(TAA),交叉反应抗原(CRA)和细胞黏附因子(I-CAM-1),增强与效应细胞的结合。BCG 治疗膀胱癌的效应阶段主要是 T 细胞和 NK 细胞起作用。抗肿瘤免疫主要以细胞免疫为主,BCG 活化 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,产生 IL-2、IL-12 等细胞因子,促使 Th0 细胞向 Th1 型细胞转化,诱导 T 细胞活化和增殖,介导细胞特异性免疫。另外,BCG 可以产生 TLRs 因子和激活单核细胞释放细胞因子 IL-12 和 IFN- α ,从而激活 NK 细胞,直接对肿瘤细胞进行杀伤^[6]。

BCG 是治疗膀胱癌的经典药物,在临床上广泛用于术后灌注,研究表明 BCG 治疗膀胱癌效果优于丝裂素(MMC),同时 BCG 灌注且持续治疗组复发危险性较 MMC 组降低 32% ($P=0.000$)^[7]。尽管 BCG 在治疗膀胱癌有良好的疗效,但是伴随较严重的毒不良反应,包括急性毒性(排尿困难、血尿、发热、膀胱刺激性等)和迟发性毒性(流感样症状、肺炎、肝炎、肉肿性前列腺炎等)^[8]。Wei 等^[9]研究猪苓多糖调节卡介苗(BCG)刺激的膀胱癌核细胞因子(NF- κ B)的作用,与对照组比较,BCG 组 IKK β 、CCL2、ICAM1 蛋白的表达和 NF- κ B p65 DNA 结合活力、NF- κ B p65 核因子的表达明显上调,而 PPS 组和联用组较 BCG 组则下调这些分子的表达。由此提示 PPS 能抑制由 BCG 引起膀胱癌细胞 NF- κ B 信号通路的过度活化,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573769);广东省科技计划资助项目(2014A030313415)

作者单位:510405 广州中医药大学第二附属医院

通讯作者:曾星,研究员,博士生导师,电子信箱:zengxing-china@163.com

猪苓多糖与 BCG 联用可以减低治疗膀胱癌过程中引起的毒性不良反应。

2. 多糖类:多糖是由 10 个以上的单糖通过糖苷键连接形成的含醛基或酮基的天然高分子聚合物,广泛存在于动物、植物、微生物中^[10]。在以往分离中药活性物质时,一般将多糖成分作为无活性物质除去。20 世纪 50 年代,由于多糖显著免疫活性的发现,使得多糖成为免疫药理学研究的热点^[11]。临床上用于抗肿瘤的多糖主要有植物多糖——猪苓多糖、香菇多糖、黄芪多糖和云芝多糖,以及动物多糖——甲壳素、肝素、硫酸软骨素等。研究发现多糖的作用机制主要是通过提高患者免疫力,影响基因表达,诱导癌细胞凋亡等。大多数多糖是非特异性免疫刺激剂,能刺激单核-吞噬细胞的增殖,增强 T 细胞和 NK 细胞的活性,从而起到避免肿瘤细胞免疫逃脱,杀灭肿瘤细胞的作用^[12]。

曾星等^[13]探索猪苓及猪苓多糖对膀胱癌大鼠巨噬细胞的吞噬功能、体外 NO 释放及共刺激分子和表面分子表达的影响,实验分为对照组、模型组、PPS 组和猪苓高中低剂量组,用流式细胞术检测荧光微球吞噬率、TLR4/CD14、CD86、CD40 的表达,Griess 试剂盒检测 NO 的释放,结果发现猪苓多糖可显著促进膀胱癌大鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能和表面免疫相关分子的表达。提示猪苓及猪苓多糖能协同 BCG 调节膀胱癌大鼠腹腔巨噬细胞表面分子的表达,降低腹腔巨噬细胞 NO 的释放,从而调节膀胱癌大鼠腹腔巨噬细胞的功能。15 只已建立 T24 荷瘤模型的裸鼠,随机分为生理盐水组、顺铂组、顺铂+灵芝多糖组,每组 5 只。观察灵芝多糖和顺铂的联合治疗效应,荷瘤裸鼠肿瘤组织的微血管密度(MVD)及血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达水平。结果发现灵芝多糖在体外能有效抑制 T24 细胞的增殖,且与顺铂联用具有协同效应,显著增强顺铂对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用($P < 0.05$),并可抑制肿瘤组织的血管生成及 VEGF、bFGF 的表达。提示灵芝多糖和顺铂能协同抑制 T24 细胞的体外增殖;可增强顺铂对 T24 荷瘤裸鼠肿瘤生长及血管生成的抑制作用,其机制可能与下调 VEGF 和 bFGF 的表达有关^[14]。

3. 过继性细胞免疫治疗:免疫系统具有防御功能,但当免疫力低下不能及时清除体内发生突变的细胞时,即会发生癌变。癌症患者普遍存在免疫力低下的特点,因而肿瘤细胞更容易发生免疫逃脱。另外,

肿瘤细胞在体内的大量增殖也会进一步抑制患者的免疫系统。而过继性细胞免疫治疗是借助分子生物学和生物工程技术从患者体内获取免疫细胞,体外培养后再回输至体内,向体内补充免疫细胞和免疫相关因子,通过靶向定位的方法,清除微小的残留病灶或明显抑制残留肿瘤细胞增殖^[15]。相关因子导入体内可以激发和增强机体的免疫应答,提高对肿瘤细胞的敏感度。67 例多发性表浅膀胱癌术后患者分成两组,36 例接受 CIK 细胞回输联合沙培林膀胱灌注疗法,31 例患者但用沙培林膀胱灌注疗法,随访 12~26 个月发现:联合组肿瘤复发率 2.78% (1/36);单用沙培林组肿瘤复发率 10.35% (6/31),差异有统计学意义。提示 CIK 细胞回输联合沙培林膀胱灌注疗法疗效优于单用沙培林^[16]。杨森等^[17]探讨 DC-CIK 联合膀胱内吡柔比星灌注治疗对浅表性膀胱癌术后复发和生存的影响。将浅表性膀胱癌手术患者 122 例分为对照组和观察组,对照组术后给予膀胱内灌注吡柔比星治疗,观察组在膀胱内灌注吡柔比星治疗的基础上给予树突状细胞(DC)和细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)治疗。随访 12 个月后发现,观察组术后累积复发率较对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DC-CIK 治疗无明显不良反应。观察组患者治疗后外周血中 CD3 T 细胞、CD4 T 细胞、CD4/CD8 比值较对照组明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示了 DC-CIK 联合膀胱内吡柔比星灌注治疗可有效降低浅表性膀胱癌术后复发率,提高了患者生存率和免疫功能。

4. 单克隆抗体:1975 年,德国科学家和英国科学家利用杂交瘤技术将产生抗体的 B 淋巴细胞同骨髓瘤细胞融合,成功的建立了单克隆抗体制备技术。小鼠的骨髓瘤细胞与经免疫过的小鼠的脾细胞融合,融合后的杂交瘤细胞具有两种亲本细胞的特性,一方面可以分泌特定的抗体,另一方面也具备了肿瘤细胞无限增殖的能力,可在体外培养条件下或移植到体内无限增殖,从而分泌大量单克隆抗体^[18]。目前用单克隆抗体对疾病进行治疗已取得了重大的突破,可治疗的疾病包括肿瘤免疫系统疾病及心血管疾病和变态反应等。李云龙等采用异型双功能连接剂 SPDP,偶联细胞穿膜(TAT-EGFP)、抗人膀胱癌单克隆抗体(BDI-1)、载丝裂霉素白蛋白纳米微球(MMC-NS)形成三联体偶联物,进行 EJ 人膀胱癌靶向结合及穿膜试验,通过激光共聚焦、扫描电子显微镜及透射电子显微镜检测其靶向结合特异性和穿膜活性。

发现 TAT-EGFP 内化 MMC-NS 人 EJ 人膀胱癌细胞内部后微绒毛消失的现象。建立裸鼠原位膀胱癌模型进行给药,发现 CPPs-BDI-1-MMC-NS 组的膀胱相对重量 (5.18 ± 4.26) 明显小于 MMC 组 ($7.12 \pm 0.27, P < 0.01$),三联体用药安全无明显骨髓抑制及肝肾功能损害^[19-21]。提示 TAT-EGFP-BDI-1-MMC-NS 三联体可以应用于膀胱肿瘤的靶向治疗。

5. 细胞因子:细胞因子 (cytokine, CK) 是具有调节固有免疫和适应性免疫及损伤组织修复等多种功能的生物学活性低分子蛋白质,分为干扰素、肿瘤坏死因子超家族、白细胞介素、集落刺激因子、趋化因子、生长因子等^[22]。这些细胞因子在体内通过旁分泌、自分泌或内分泌方式分泌到细胞内及细胞外,具有多效性、重叠性、拮抗性、协同性等多种生理特性,调控人体多种重要的生理功能^[23]。细胞因子抗癌生物疗法的机制目前尚未完全明确,但归纳起来细胞因子的抗肿瘤机制主要包括以下方面:控制癌细胞的生长并促进其分化,调节宿主的免疫应答,如 IL-2 可激发 NK、LAK、TIL、CIK 及 DC 等细胞的活性,从而增强抗肿瘤作用,对肿瘤细胞的直接毒性作用,破坏肿瘤细胞血管和营养供应,刺激造血功能,促进骨髓恢复等^[24]。35 例膀胱癌术后灌注患者,随机分成两组,即干扰素- α (IFN- α) 联合吡柔比星组和单用吡柔比星组。随访 6~32 个月,发现 4 例观察干扰素- α 联合吡柔比星灌注复发,单用吡柔比星组复发人数为 8 例并伴有较大的不良反应。提示干扰素- α 联合吡柔比星单独得到比更好的效果 ($P < 0.05$)。

6. CAR-T 细胞治疗:抗体源性靶向区与 T 细胞信号区融合形成嵌合型抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR),T 细胞表达 CARs 后赋予 T 细胞抗原特异性,这种特异性是由 CARs 中的靶向区决定的。CARs 与 TAA 结合能够活化 CAR-T 细胞,进而增殖,释放细胞因子,杀伤肿瘤细胞。目前 CAR-T 主要有 4 代,2 代是在 1 代的基础上添加 1 个胞内信号区,3 代则是在胞内添加了两个串联的共刺激信号区,而第 4 代 CARs (又称 TRUCKs),即应用编码 CAR 和 CAR 反应性启动子的载体构建 CAR。Claudia 等构建的 CD19RCD28⁺ T 细胞,体外研究表明这种 CAR-T 细胞具有特异的抗肿瘤细胞作用,在动物模型体内具有明显抑制肿瘤生长作用;说明 CD19RCD28⁺ 特异性 CAR-T 细胞在体外不仅具有识别和杀伤癌细胞作用,并且体内具有诱导肿瘤消退

作用,这一结果为部分肿瘤患者的治疗带来了新的希望。

二、特异性免疫治疗

肿瘤疫苗治疗是主要的特异性免疫治疗。肿瘤疫苗是直接应用肿瘤抗原进行主动免疫治疗的一种方法,是将肿瘤抗原以多种形式如肿瘤细胞、肿瘤相关蛋白或多肽以及表达肿瘤抗原的基因等导入患者体内,以此克服肿瘤引起的免疫抑制状态,增强免疫原性“激活患者自身的免疫系统”诱导机体细胞免疫和体液免疫反应从而达到控制或清除肿瘤的目的。将已建立 C57BL/6 小鼠皮下 MB49 膀胱癌模型的 60 只荷瘤小鼠随机分为 5 组,即白细胞介素 21 (IL-21) 膜表面修饰疫苗组、单纯游离 IL-21 组、GFP 膜表面修饰疫苗组、单独灭活 MB49 肿瘤疫苗组、PBS 组。利用已制备的小鼠膀胱癌 MB49 细胞疫苗进行治疗,通过检测各组小鼠肿瘤体积变化及 CTL 来评价疫苗的抗肿瘤功能。结果成功制备了 IL-21 膜表面修饰 MB49 疫苗。IL-21/MB49 疫苗可显著抑制肿瘤生长并产生长期特异性免疫反应 ($P < 0.05$)。在同一效靶比下 IL-21/MB49 疫苗组的 CTL 杀伤活性显著高于其他组 ($P < 0.05$),提示蛋白膜锚定技术可将 IL-21 高效锚定于 MB49 细胞膜表面制备成 IL-21 膜表面修饰膀胱癌肿瘤疫苗,该疫苗既可保持 IL-21 生物学活性又可明显增强 CTL 杀伤肿瘤膀胱癌细胞的活性。80 例进行性膀胱癌患者被随机分成两组,一组接受个性化的肽疫苗 (根据患者的白细胞抗原类型,肽特异性 IgG 的高效价水平等匹配程度) 联合铂类化疗药物治疗 ($n = 39$);另一组单用铂类化疗药物治疗 ($n = 41$)。结果发现两组进展生存率差异无统计学意义,但是生存期限差异有统计学意义,联合组的平均生存期限为 7.9 个月,单用铂类化疗药组为 4.1 个月。提示个性化的肽疫苗治疗膀胱癌具有低毒,高免疫应答的特点,并能够延长患者的生存时间的特点。

三、展 望

传统的肿瘤治疗方法是手术结合化学药物治疗和放射性治疗。但是这两种方法由于治疗的靶向性不高,常会连同正常细胞一起杀灭,产生较为严重的不良反应,因而限制了在临床上的使用。免疫疗法的出现为膀胱癌的治疗提供了新的曙光,例如 CAR-T 细胞治疗运用于临床,已经取得了较好的疗效。免疫治疗与传统放、化疗最大的不同点是特异性高,不良反应相对较少,但同时也存在着一些问题,限制了免

疫治疗方法运用于临床,主要体现在以下两个方面:
①不同个体之间治疗效果差异较大;②对于免疫治疗的疗效评价评估仍有较大的争议,没有形成统一的标准。免疫治疗未来的趋势是精准化治疗、个体化治疗,相信这些问题都会得到进一步解决。

参考文献

- 1 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展,2013,11(1):89-95
- 2 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌死亡现状及流行趋势分析[J]. 现代泌尿外科杂志,2013,18(3):228-232
- 3 Chou R, Buckley D, Fu R, *et al.* Emerging approaches to diagnosis and treatment of non - muscle - invasive bladder cancer [MD]. Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2015
- 4 Prescott S, Jackson AM, Hawkyard SJ, *et al.* Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette - Guérin: local immune mechanisms [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(Suppl 3):S91-93
- 5 Fuge O, Vasdev N, Allchorne P, *et al.* Immunotherapy for bladder cancer[J]. Res Rep Urol, 2015,7(2):65-79
- 6 Jokisch JF, Karl A, Stief C. Intravesical immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer [J]. Indian J Urol, 2015, 31(4):304-311
- 7 Aldemir M, Canda AE, David E, *et al.* An individual patient data meta - analysis of the long - term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette - Guérin for non - muscle - invasive bladder cancer [J]. Eur Urol, 2009, 56(2):247-256
- 8 曲知专. 沙培林、吡柔比星、丝裂霉素单独膀胱灌注预防表浅膀胱癌术后复发的疗效及副作用比较[D]. 广州:暨南大学,2014
- 9 Wei JA, Zeng X, Han L, *et al.* The regulatory effects of polyporus polysaccharide on the nuclear factor kappa B signal pathway of bladder cancer cells stimulated by Bacillus Calmette - Guérin [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(7):531-536
- 10 赵艳. 菇类多糖提取及性能研究[D]. 石家庄:河北科技大学,2013
- 11 林俊,李萍,陈靠山. 近5年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国

中药杂志,2013,38(8):1116-1125

- 12 尚庆辉,解玉怀,张桂国,等. 植物多糖的免疫调节作用及其机制研究进展[J]. 动物营养学报,2015,27(1):49-58
- 13 曾星,李彩霞,黄羽,等. 猪苓及猪苓多糖对膀胱癌模型大鼠腹腔巨噬细胞吞噬和表面免疫相关分子表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(5):414-418
- 14 郭鹏荣,盛玉文,刘奔,等. 灵芝多糖对顺铂抑制荷膀胱癌 T24 细胞裸鼠肿瘤生长及血管生成作用的影响[J]. 解放军医学杂志,2014,39(6):470-474
- 15 陶累累,黄桂春,陈龙邦. 肿瘤过继性细胞免疫治疗增效策略及研究进展[J]. 癌症进展,2014,12(6):522-527
- 16 袁润强,郑少斌,敖道畅. CIK 细胞回输联合沙培林膀胱灌注预防表浅膀胱癌术后复发[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志,2009,3(3):214-217
- 17 杨森,南存金,木海琦,等. 自体 DC - CIK 联合膀胱内吡柔比星灌注治疗对浅表性膀胱癌术后复发和生存的影响[J]. 温州医学院学报,2013,43(11):746-749
- 18 孔君,刘箐,韩跃武,等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志,2011,02:170-173
- 19 李云龙. CPPs - BDI - 1 - 载 MMC 白蛋白纳米微球三联体靶向治疗膀胱肿瘤[D]. 苏州:苏州大学,2012
- 20 李云龙,王伟录,梁东彦,等. CPPs - BDI - 1 - 载吡柔比星白蛋白纳米微球三联体杀伤 EJ 人膀胱癌细胞实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,27:4060-4063
- 21 李云龙,王伟录,王勇,等. CPPs - BDI - 1 - 载蟾酥白蛋白纳米微球三联体杀伤 EJ 人膀胱癌细胞实验研究[J]. 中国医刊,2014,11:54-56
- 22 李曼曼,柳祖辉,袁玉婷,等. 抗肿瘤疫苗的研究进展[J]. 中国当代医药,2015,28:14-17
- 23 于程程,贾春娥,陈风华,等. 细胞因子在急性放射病治疗中研究进展[J]. 中国职业医学,2012,5:437-439
- 24 姬广辉,杨平. 肿瘤过继性细胞免疫治疗研究进展[J]. 转化医学杂志,2015,4:229-233

(收稿日期:2016-03-12)

(修回日期:2017-01-08)

(上接第10页)

- 18 Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial - to - mesenchymal transition[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 116:317-36
- 19 Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. Cell, 2011, 147(2):275-292
- 20 Smith SC, Theodorescu D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4):253-264
- 21 Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, *et al.* Epithelial E - and P - cadherins: role and clinical significance in cancer[J]. Bioclim Biophys Acta, 2012, 1826(2):297-311
- 22 Mandville JA, Silva Nato B, Vanni AJ, *et al.* P - cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder car-

cinoma cells[J]. BJU Int, 2008, 102(11):1707-1714

- 23 Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, *et al.* Overexpressed P - cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho - family GTPases[J]. Cancer Res, 2005, 65(8):3092-3099
- 24 Shin S, Dimitri CA, Yoon So, *et al.* ERK2 but not ERK1 induces epithelial - to - mesenchymal transformation via DEF motif - dependent signaling events[J]. Mol Cell, 2010, 38(1):114-127
- 25 Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer[J]. Genes Dev, 2011, 25(19):1999-2010

(收稿日期:2017-04-01)

(修回日期:2017-04-08)