

·综述 General review·

肿瘤冷冻消融免疫效应研究的进展

韩宗宏, 曹建民, 史东宏

【摘要】 冷冻消融由于其创伤小、疗效佳、并发症少等优点,使其在临床实体肿瘤的治疗中得到广泛的应用。冷冻消融的另一个可能的优势是诱导机体产生抗肿瘤免疫,进而导致远处转移灶及局部残存肿瘤的消退。然而大量的临床及实验研究表明肿瘤冷冻后所致的抗肿瘤免疫效应变化很大,且对机体抗肿瘤免疫效应既可以是免疫刺激亦可以是免疫抑制。本文就冷冻免疫存在的形式及可能影响因素作一综述。

【关键词】 冷冻消融;免疫;恶性肿瘤

中图分类号:R730.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2013)-12-1055-04

Immunologic effect of cryoablation for tumor: recent progress in research HAN Zong-hong, CAO Jian-min, SHI Dong-hong. Department of Medical Imaging, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu Province 210002, China

Corresponding author: CAO Jian-min, E-mail: nanzongcjm@tom.com

【Abstract】 Clinically, cryoablation has been widely used for the treatment of tumors, as this technique is minimally-invasive and highly-effective with fewer complications. In addition, another possible advantage is the cryoablation may induce the body to generate anti-tumor immunity, possibly leading to the regression of the distant metastases and the local residual tumor lesions. However, a large number of clinical and experimental studies have indicated that the anti-tumor immunologic effect induced by cryoablation varies greatly, and such an anti-tumor immunologic effect may be either immunostimulatory or immunosuppressive. This paper aims to make a comprehensive review concerning the existence form of cryo-immunology and its possible influencing factors. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 1055-1058)

【Key words】 cryoablation; immunity; malignant tumor

冷冻消融就是利用极低温度破坏病变组织,目前已广泛应用于各种实体恶性肿瘤治疗。临床应用冷冻消融过程中,人们发现冷冻消融肿瘤后其坏死组织通过自体吸收可能刺激机体产生特异性抗肿瘤免疫效应,而有利于远处转移灶及局部残留肿瘤的消除。然而随着免疫学的发展及冷冻免疫研究的深入,人们发现影响冷冻消融的抗肿瘤免疫效应的因素众多,而这些因素的改变可能导致免疫效应的明显不同。

1 冷冻消融治疗肿瘤的免疫效应观察

1.1 冷冻免疫刺激作用

Lubaroff 等^[1]通过观察小鼠腺癌冷冻模型后发

现,冷冻消融后机体对再种植肿瘤出现生长抑制的情况。Sabel 等^[2]通过冷冻预处理原发肿瘤以增加局部引流淋巴结内肿瘤特异性淋巴细胞的数目,然后取相应的局部淋巴结体外扩增后回输至体内,发现冷冻消融预处理后的肿瘤引流淋巴结(tumor draining lymph nodes, TDLN)较其他组肺转移显著减少,提示冷冻消融可以产生肿瘤特异性 T 细胞从而消除转移灶,且该细胞毒性对其他不同抗原的肿瘤无影响,提示冷冻消融术后机体的抗肿瘤免疫效应是肿瘤特异性的。

1.2 冷冻免疫的双重作用

Urano 等^[3]通过小鼠脾脏种植肿瘤后建立肝转移瘤模型,然后冷冻肝脏转移瘤发现,仅冷冻 1 个转移结节的小鼠其肝脏转移灶数目显著减少,而冷冻多个结节的小鼠其肝脏出现了更多的结节,提示增加肿瘤的冷冻消融体积可能会导致免疫抑制。

Misao 等^[4]通过建立小鼠的乳腺癌模型后行冷冻消融及手术切除治疗比较两者术后对再种植肿瘤的抑制情况发现, 尽管手术切除组在术后 1~3 周内较冷冻消融组有着较高的再种植抑制率, 但在此后至 10 周冷冻消融组(80%)较手术组(18%)有着明显再种植抑制率, 且局部淋巴结转移明显降低。据此, 作者提出冷冻消融后机体在早期可能会是免疫抑制状态, 而在持续一段时间后可表现为免疫增强。

1.3 无冷冻免疫效应

Allen 等^[5]通过比较小鼠肝脏肿瘤种植模型手术组、对照组、冷冻消融组后发现, 术后并无明显免疫反应及相关免疫指标的改变, 进而得出冷冻消融无明显免疫刺激作用。Hoffman 等^[6]研究发现尽管冷冻消融术后机体可以产生大量的抗肿瘤抗体, 但其对再种植的肿瘤的生长无明显影响。

1.4 冷冻免疫抑制作用

Yamashita 等^[7]通过比较冷冻组及手术组后发现, 冷冻组(48.4%)较手术组(11.8%)有着更高的转移率, 且如果手术切除冷冻组织则出现转移率下降, 而将切除的冷冻肿瘤组织再种植于手术组小鼠上时出现转移率增加的现象。Shibata 等^[8]通过冷冻术前 1 d 已建立好的纤维肉瘤肺转移模型的皮下肿瘤结节后发现冷冻消融加速的肺转移, 且对再种植的肿瘤无抑制生长作用。

2 冷冻消融影响免疫的基本机制

为了更好的理解冷冻消融如何影响机体免疫系统, 我们首先应了解冷冻消融如何杀伤肿瘤细胞以及机体免疫反应是如何产生的。

2.1 冷冻消融治疗肿瘤的基本原理

冷冻消融主要通过快速降温使冰球内靠近冷冻刀的细胞内外冰晶形成及远离冷冻刀的细胞渗透性溶解而导致肿瘤细胞的坏死或诱发其凋亡。上述冷冻损伤亦破坏微血管的内皮细胞, 使内皮下胶原暴露、血小板聚集致微循环血栓形成, 导致肿瘤组织缺血、缺氧进一步加重肿瘤的坏死。而当部分肿瘤血管内的血栓再通时可因再灌注损伤而加重肿瘤细胞的坏死^[9]。冰球内的温度降低速度不同, 故其对组织的损伤表现亦不同, 在肿瘤的中心区表现为液化性坏死, 而周围则表现为凋亡。

2.2 机体免疫反应基本机制

由上所述我们知道冷冻消融最终导致以坏死或凋亡的形式导致细胞死亡, 但其对机体免疫功能的影响却明显不同。一般认为坏死通常伴随着组织

损伤, 其特点为细胞的崩解及细胞内容物的释放, 如促炎症细胞活素、热休克蛋白、DNA、RNA 等, 这些因子通常具有免疫刺激作用可以刺激机体产生免疫反应。而凋亡则不像坏死那样释放细胞内容物, 其细胞碎片为巨噬细胞或树突状细胞(dendritic cell)所吞噬, 但不引起炎症反应。目前的研究表明在正常的生理条件下凋亡不但不刺激免疫系统反而起抑制作用, 其可能原因为吞噬了凋亡细胞的树突状细胞抑制细胞毒性产物的生成及自身的成熟, 而诱发局部克隆缺失及无能^[9]。但在炎症条件下凋亡的细胞可能较坏死的细胞更能刺激抗肿瘤免疫反应, 其可能原因为吞噬凋亡细胞的树突状细胞将凋亡细胞的抗原成分以 MHC I 类分子限制的方式递呈给细胞毒性 T 细胞(CTL), 尚未清除的凋亡细胞可能会发生二次坏死并释放促炎症信号, 而在此状态下树突状细胞成为表达抗原及诱发效应 T 细胞的理想状态^[10]。故目前认为正常情况下凋亡细胞导致免疫沉默或免疫抑制, 而在炎症条件下可能导致免疫刺激。

冷冻消融后可释放大量的细胞内容物及细胞因子, 这些细胞因子刺激循环血内粒细胞进入损伤部位。最先浸润受损部位细胞主要来自于固有免疫系统(单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞)其不仅直接对肿瘤细胞起杀伤作用, 而且释放各种细胞因子调节局部微环境。而获得性免疫则发生在抗原提呈细胞吞噬相关抗原后, 并最终形成体液免疫和细胞免疫。细胞因子一方面来源于冷冻消融的组织, 如冷冻消融的肿瘤细胞、间质细胞瘤、免疫细胞等。另一方面来源于肿瘤细胞本身, 大量的研究表明很多的肿瘤细胞可以分泌细胞因子而影响肿瘤局部免疫功能, 而这些细胞因子常为免疫抑制作用, 如 IL-10、TGF- β 等, 导致抗肿瘤免疫效应消失, 其为肿瘤逃脱免疫监视的一个原因^[11]。当冷冻消融肿瘤时, 上述细胞因子的释放可能会使调节性 T 细胞(Treg)的增殖、树突状细胞的抗原提呈能力下降而导致免疫耐受或免疫抑制的加强。其可能为冷冻消融后导致免疫抑制的一个原因, 尤其是冷冻消融后发生的早期免疫抑制现象。因此, 冷冻消融术后机体的免疫状态的变化可能与肿瘤的类型及其最初分泌的免疫调节因子有关。

冷冻消融后局部病理检查常可见巨噬细胞的快速浸润, 而由于冷冻消融致微血管的破坏可能延缓血-骨髓来源的树突状细胞的浸润, 进而使冷冻术后当树突状细胞浸润消融部位时大部分的坏死

组织可能已被巨噬细胞所吞噬。如果巨噬细胞吞噬了大部分的肿瘤细胞碎片的话将导致免疫反应从细胞免疫偏向体液免疫,因为巨噬细胞的抗原提呈能力远弱于树突状细胞,且巨噬细胞进一步释放 IL-10、TGF- β 抑制 T 细胞反应,从而导致无法有效的诱导抗肿瘤细胞免疫。目前尚不清楚树突状细胞在消融术后其浸润消融部位的程度及其吞噬坏死和凋亡细胞的程度。树突状细胞摄取抗原的另一种不浸润消融肿瘤途径是通过摄取抗原-抗体复合物或免疫复合物。冷冻消融释放的抗原和血清内抗体相结合形成免疫复合物,树突状细胞常表达 FC γ R,其可以和 IgG 的 FC 片段相结合,导致免疫复合物被其内化吞噬,进一步递呈抗原诱导机体免疫反应^[12]。然而大量的抗原亦可以导致“高带耐受”,其是一种抗原过多所致的免疫抑制,可能是其导致 Treg 细胞活化而抑制免疫反应。Treg 是具有能识别靶细胞主要组织相容性复合体(MHC)类分子所提呈的 T 细胞受体自身抗原肽,并能发挥一定的免疫抑制功能的 T 细胞。通过下调机体针对外来抗原或自身抗原的免疫应答水平,以维持自身耐受。主要表现为免疫无能和免疫抑制,实验表明这个过程主要是通过细胞与细胞之间直接接触抑制来实现,也可能是通过分泌某些免疫抑制性细胞因子(如 IL-4、IL-10、TGF- β)而发挥其抑制免疫功能的^[13]。

3 冷冻免疫机制探讨

尽管关于冷冻消融治疗肿瘤所致的抗肿瘤免疫效应目前尚未达成一致共识,但从目前的研究情况来看我们至少可以得出以下结论:① 冷冻消融治疗肿瘤后可以释放大量的肿瘤抗原;② 冷冻免疫效应在一定条件下可以发生改变。

Urano 等^[3]通过比较冷冻消融术后肝转移灶的情况后发现,小体积的肿瘤消融较大体积的肿瘤消融可减少肝脏转移灶的发生,并推测其可能机制是由于肿瘤冷冻消融后短时间内释放大量的抗原而产生高带耐受现象并诱导 Treg 活化,而在加入免疫调节剂云芝多糖 K 后则可显著降低免疫抑制效应。通过检测 TNF- α 、INF- γ 、IL-4、IL-10 后发现加入云芝多糖 K 后 TNF- α 、INF- γ 含量增加,而 IL-4、IL-10 明显降低。其可能原因是云芝多糖 K 对肿瘤抗原具有较高的亲和力,消除了高带耐受现象。Sabel 等^[14]通过改变冷冻速率后发现,高速冷冻导致肿瘤特异性 T 细胞在 TDLN 内明显增加,肺转移灶减少,而低速冷冻则导致 Treg 增加,肺转移灶增多提

示免疫抑制,并推测其可能原因为高速冷冻导致细胞的坏死为主,而低速冷冻则导致细胞以凋亡为主。尽管作者对该现象的解释受到了一定的质疑,但其说明了冷冻免疫反应与冷冻消融的技术条件有关。Whelan 等^[15]通过瘤内注射包含有 GM-CSF 和 B7-1 的质粒及抗 CD25 抗体钝化 Treg 的功能联合冷冻消融治疗,取得了良好的治疗效果。该实验表明虽然单纯冷冻消融并不引起机体明显的抗肿瘤免疫效应,但通过强化机体免疫刺激因素减弱抑制因素可取得良好的抗肿瘤免疫效果。Machlenkin 等^[16]和 Udagawa 等^[17]分别通过瘤内注射未成熟的树突状细胞和经过卡介苗预处理后的树突状细胞联合冷冻消融治疗明显增强机体的抗肿瘤免疫能力,提示单纯冷冻消融治疗时可能由于冷冻所致的微循环血栓形成导致 DC 提呈的抗原不足,继而难以诱发机体产生抗肿瘤免疫反应。Waitz 等^[18]研究显示冷冻消融联合细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 阻滞剂可以延缓或阻止继发性肿瘤的生长,其对继发性肿瘤生长的抑制作用与增加肿瘤内效应性 T 细胞(Teff)的浸润和表达有关(对照组未见明显上述细胞的浸润),同时其增加 Teff 和 Treg 的比值(是由于 Teff 的增加而非 Treg 的减少所致)。Zeelenberg 等^[19]通过比较不同位置抗原的在冷冻术后对机体的免疫刺激效应后发现,以分泌囊泡形式存在的抗原较可溶性抗原及细胞相关性抗原可以诱发更为强烈的抗原特异性 CTL、CD4+ T 细胞、抗原相关的特异性抗体增加,减少瘤内 Treg 的比例,提示肿瘤抗原的存在形式与冷冻消融术后的免疫效应产生有关。Osada 等^[20]通过检测肝癌冷冻消融术后血浆内细胞因子(IL-2、4、6、10、TNF- α 、INF- γ)的变化发现,有部分患者不仅有局部疗效而且出现远离治疗部位结节内坏死的证据。这些患者在治疗前就有较高的 TNF- α 水平且术后明显升高,相比较而言无免疫反应组治疗前后 IL-10 水平明显较免疫组升高,且 Th1/Th2(INF- γ /IL-4)比值增加,提示机体的自身免疫状态与冷冻术后的抗肿瘤免疫效应有关。

越来越多的证据表明单纯冷冻消融治疗并不足以产生足够的临床免疫效果,且免疫反应具有双重性,因此如何应用冷冻消融技术及免疫调节剂来达到最大的冷冻免疫效果,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Lubaroff DM, Canfield L, Feldbush TL, et al. R3327

- adenocarcinoma of the Copenhagen rat as a model for the study of the immunologic aspects of prostate Cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1977, 58: 1677 - 1689.
- [2] Sabel MS, Arora A, Su G, et al. Adoptive immunotherapy of breast Cancer with lymph node cells primed by cryoablation of the primary tumor[J]. Cryobiology, 2006, 53: 360 - 366.
- [3] Urano M, Tanaka C, Sugiyama Y, et al. Antitumor effects of residual tumor after cryoablation: the combined effect of residual tumor and a protein-bound polysaccharide on multiple liver metastases in a murine model[J]. Cryobiology, 2003, 46: 238 - 245.
- [4] Misao A, Sakata K, Saji S, et al. Late appearance of resistance to tumor rechallenge following cryosurgery. A study in an experimental mammary tumor of the rat [J]. Cryobiology, 1981, 18: 386 - 389.
- [5] Allen PJ, D'Angelica M, Hodyl C, et al. The effects of hepatic cryosurgery on tumor growth in the liver [J]. J Surg Res, 1998, 77: 132 - 136.
- [6] Hoffmann NE, Coad JE, Huot CS, et al. Investigation of the mechanism and the effect of cryoimmunology in the Copenhagen rat[J]. Cryobiology, 2001, 42: 59 - 68.
- [7] Yamashita T, Hayakawa K, Hosokawa M, et al. Enhanced tumor metastases in rats following cryosurgery of primary tumor [J]. Gann, 1982, 73: 222 - 228.
- [8] Shibata T, Suzuki K, Yamashita T, et al. Immunological analysis of enhanced spontaneous metastasis in WKA rats following cryosurgery [J]. Anticancer Res, 1998, 18: 2483 - 2486.
- [9] Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses[J]. Cryobiology, 2009, 58: 1 - 11.
- [10] Scheffer SR, Nave H, Korangy F, et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo[J]. Int J Cancer, 2003, 103: 205 - 211.
- [11] 彭素芳, 王胜军, 陈建国, 等. 胃癌患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的特异性转录因子与相关细胞因子的检测及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32: 186 - 189.
- [12] 白 易, 钱 程, 曹雪涛. 树突状细胞亚群的不同迁移模式及相关研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26: 845 - 849.
- [13] Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in Cancer and why? [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22: 327 - 334.
- [14] Sabel MS, Su G, Griffith KA, et al. Rate of freeze alters the immunologic response after cryoablation of breast Cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17: 1187 - 1193.
- [15] Whelan MC, Casey G, MacConmara M, et al. Effective immunotherapy of weakly immunogenic solid tumours using a combined immunogene therapy and regulatory T-cell inactivation [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17: 501 - 511.
- [16] Machlenkin A, Goldberger O, Tirosh B, et al. Combined dendritic cell cryotherapy of tumor induces systemic antimetastatic immunity[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 4955 - 4961.
- [17] Udagawa M, Kudo - Saito C, Hasegawa G, et al. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette - Guerin cell wall skeleton stimulation[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 7465 - 7475.
- [18] Waitz R, Solomon SB, Petre EN, et al. Potent induction of tumor immunity by combining tumor cryoablation with anti - CTLA-4 therapy[J]. Cancer Res, 2012, 72: 430 - 439.
- [19] Zeelenberg IS, van Maren WW, Boissonnas A, et al. Antigen localization controls T cell - mediated tumor immunity [J]. J Immunol, 2011, 187: 1281 - 1288.
- [20] Osada S, Imai H, Tomita H, et al. Serum cytokine levels in response to hepatic cryoablation [J]. J Surg Oncol, 2007, 95: 491 - 498.

(收稿日期:2013-05-06)

(本文编辑:俞瑞纲)