

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.011

文章编号: 1005-8982 (2018) 19-0055-07

DC-CIK 生物治疗后肺癌患者 Pro-GRP 和 T 淋巴细胞亚群对免疫功能评价的临床意义

何丽杰, 冯贺强, 褚相南, 吕玉洋, 张贺平

(天津市第五中心医院 检验科, 天津 300450)

摘要: 目的 探讨生物治疗前后肺癌患者胃泌素释放肽前体 (Pro-GRP) 和 T 淋巴细胞亚群对免疫功能评价的临床意义, **方法** 选取 2014 年 9 月 -2015 年 8 月天津市第五中心医院收治病理确诊的肺癌患者 45 例, 根据病理组织学分为小细胞肺癌组 (SCLC) 和非小细胞肺癌组 (NSCLC), 选取同期健康体检者 40 例为对照组。采用贝克曼 - 库尔特 FC500 流式细胞仪检测受检者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、调节性 T 细胞 (Treg), 采用德国罗氏 COBAS 6000 检测受检者外周血的 Pro-GRP、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、癌胚抗原 (CEA)、细胞角蛋白 19 的可溶性片段 (CYFAR21-1), 化疗结束后, 联合生物治疗 DC-CIK 自体细胞回输 3 个周期后, 用相同方法采集患者静脉血, 检测 Pro-GRP、T 淋巴细胞亚群、Treg。**结果** DC-CIK 细胞生物治疗后 NSCLC 组 CD8⁺T 淋巴细胞和 Treg 细胞较治疗前下降, CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前上升; SCLC 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量较治疗前增加, Treg 细胞较治疗前下降; Pro-GRP 各组均较治疗前下降; Pro-GRP 与 T 淋巴细胞亚群在 SCLC 组呈负相关, 在 NSCLC 组无相关; Pro-GRP 与 Treg 细胞在各组呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** Pro-GRP 在 SCLC 患者与 T 淋巴细胞亚群存在相关性, 可用于辅助早期临床诊断, 并与 T 淋巴细胞亚群共同评价患者的免疫调节功能, DC-CIK 细胞回输生物治疗可增强患者特异性杀伤肿瘤的能力, 提高机体的免疫监视功能, 抑制肿瘤免疫逃逸, 改善患者的免疫功能。

关键词: Pro-GRP; T 淋巴细胞亚群; Treg 细胞; 生物治疗

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Value of Pro-GRP and T lymphocyte subsets in assessment of immune functions of lung cancer patients after DC-CI biological therapy

Li-jie He, He-qiang Feng, Xiang-nan Chu, Yu-yang Lü, He-ping Zhang
(Clinical Laboratory, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China)

Abstract: Objective To discuss the clinical meanings of Pro-GRP and T lymphocyte subpopulation for the assessment of immune functions of lung cancer patients before and after biological therapy. **Methods** Forty-five lung cancer patients from Tianjin Fifth Central Hospital from September 2014 to August 2015 were recruited and divided into small cell lung cancer (SCLC) group and non-small cell lung cancer (NSCLC) group according to the pathological histology. Forty healthy people having physical examination at the same period were enrolled as the control group. Beckman Coulter FC500 flow cytometry was adopted to detect the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and regulatory T cells (Treg) in the peripheral blood. COBAS6000 produced by Germany-based Roche was used to detect the Pro-GRP, neuron-specific enolase (NSE), CEA and cytokeratin 19 fragment (CYFAR21-1) in the peripheral blood. After chemical therapy and three cycles of combined biological therapy of successive retransformation of DC-CIK autologous cells, the same method was used to collect the venous blood of the patients to detect Pro-GRP, T lymphocyte subpopulation and Treg. **Results** After DC-CIK cell biological therapy, CD8⁺ T lymphocytes and Treg

收稿日期: 2017-10-11

[通信作者] 冯贺强, E-mail: 523255574@qq.com

cells decreased, and its CD3⁺, CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio increased in the NSCLC group compared to those before treatment ($P < 0.05$); CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes increased and Treg cells decreased in the SCLC group compared with those before treatment ($P < 0.05$). In each group, Pro-GRP decreased after treatment compared with that before treatment ($P < 0.05$). There were obvious negative correlations between Pro-GRP and T lymphocyte subsets in the SCLC group ($P < 0.05$) but not in the NSCLC group ($P > 0.05$); there was a positive correlation between Pro-GRP and Treg cells in each group with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusions** Pro-GRP is correlated with T lymphocyte subsets in the patients with small cell lung cancer. It can assist the early clinical diagnosis and along with T lymphocyte subpopulation it can be used to assess the immune regulatory function of the patients. DC-CIK cell retransformation biological therapy enhances patients' specific ability of killing tumors, improves the immune surveillance function, restrains the immune escape of tumor and improves patients' immune functions.

Keywords: Pro-GRP; T lymphocyte subpopulation; Treg cell; biological therapy

肺癌是目前世界上发病率和致死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。世界卫生组织发布的《World Cancer Report 2014》指出肺癌仍是最普遍和最致命的癌症。在中国,随着空气污染等问题的日趋严重,每年肺癌新发病例为 67.6 万,死亡病例为 56.5 万,均居世界各国肺癌发病率和死亡率的第 1 位。由于小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 临床上表现为高度恶性,肿瘤增长较快,早期即发生区域淋巴结转移、复发及远处转移,约 70% 的肺癌患者在确诊时已经属于晚期,大部分患者丧失手术机会,转而接受常规的化疗、放疗,而放疗的不良药物反应和耐药性让很多患者难于接受。在过去的 20 年中,生物免疫治疗被认为是一种新的“绿色疗法”逐渐受到关注,其治疗的原理是体外扩增效应细胞 (如 NK 细胞、DC 细胞、CIK 细胞等),通过回输效应细胞,刺激机体的免疫应答,依赖效应细胞本身的高杀伤活性及自体的免疫系统共同抗击肿瘤细胞。DC-CIK 治疗被广泛使用,因为它对多种癌症的高增殖率和细胞毒活性,简单而温和的培养期,很少有不良反应且提高患者满意度和依从性^[2]。

本实验基于 DC-CIK 生物治疗的研究,通过收集肺癌患者未治疗前和经生物治疗 1 个月后血,监测治疗前后免疫功能、肿瘤标志物等的变化,探讨 DC-CIK 细胞治疗对肺癌患者的治疗效果,明确其对肺癌患者免疫功能的影响。本研究将对肺癌患者的支持治疗及改善生活质量具有积极意义,可为临床规范应用 DC-CIK 细胞治疗肺癌提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 9 月-2015 年 8 月天津市第五中心医院就诊的肺癌患者 45 例,其中,男性 31 例,女

性 14 例;年龄 43 ~ 86 岁,中位数 62 岁。所有患者均经过病理学确诊,其中小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 13 例,非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 32 例,所有患者均为首次来院就诊,均无其他免疫相关性疾病,且不合并其他恶性肿瘤,检测前未接受过放疗及免疫治疗。对照组选取同时期健康体检者 40 例,其中,男性 22 例,女性 18 例;年龄 56 ~ 64 岁,中位数 60 岁。放疗、生物治疗前清晨空腹采集患者肘正中静脉血 5 ml,胃泌素释放肽前体 (Pro-gastrin-releasing peptide, Pro-GRP) 采用分离胶促凝管, T 淋巴细胞亚群及调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 采用 EDTA-K2 抗凝血,采血后立即送检验科 4 h 内检测完毕。

1.2 仪器与试剂

电化学发光免疫分析仪 Cobas E601 (德国罗氏诊断有限公司), FC500 流式细胞仪 (美国贝克曼-库尔特公司), 血细胞分离机 (美国 FRESenius KABI 公司), Pro-GRP、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)、细胞角蛋白 19 的可溶性片段 (cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1) 检测试剂盒 (德国罗氏诊断有限公司)。四色淋巴细胞亚群 CD45-FITC/CD4-RD1/CE8-ECD/CD3-PC5、CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5、溶血素 (OptiLyse C) Flow Count 计数微球、0.01 mol PBS 溶液、Immuntrol 质控血 (美国贝克曼-库尔特公司)。

1.3 实验分组

生物治疗前 Pro-GRP、T 淋巴细胞亚群分 3 组,即对照组、SCLC 组、NSCLC 组。生物治疗后分两组,即 SCLC 组、NSCLC 组。

1.4 实验方法

1.4.1 Pro-GRP、CEA、NSE 及 CYFRA21-1 检测

在 LIS 系统输入患者信息, 受检者外周血的 Pro-GRP、CEA、NSE、CYFRA21-1 按照仪器及试剂使用说明书要求上机检测, 将结果分组记录。

1.4.2 T 淋巴细胞亚群检测 将样本编号并录入实验室信息系统 (LIS), 准备与样本相同数量流式细胞管并编号, 在已编号流式细胞管中各加入 10 μ l 四色抗体, 涡旋混匀, 室温避光放置 15 ~ 20 min; 在已编号流式细胞管中用反向加样法分别加入 100 μ l 全血, 取出试管, 每管加入 500 μ l Opti Lyse C 溶血素并立涡旋混匀 2 s, 20 ~ 25 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min; 在流式细胞管中加入 500 μ l PBS, 室温平衡 5 min; 取出 Flow-Count 荧光微球, 涡旋震荡器匀 10 ~ 12 s, 以反向加样法在各管中加入 100 μ l 荧光微球 (荧光微球的加样量与样本量一致), 充分混匀, 2 h 内上机检测; 登录至 LIS 并复核转录是否正确。

1.4.3 Treg 细胞检测 取静脉血 100 μ l 加入已编号流式细胞管, 分别加入 CD4-PE 标记 CD25-FITC 标记的荧光单克隆抗体 20 μ l, 涡旋混匀, 室温避光放置 15 ~ 20 min, 加入细胞裂解液 4 ml, 涡旋混匀, 室温避光放置 10 min 待红细胞完裂解, 离心取上清, 加入 2 ml PBS 洗涤 2 次, 上机检测。

1.4.4 DC-CIK 细胞生物治疗 血细胞分离机循环外周血 4 000 ~ 5 000 ml, 采集肿瘤患者外周血, 循环 4 次, 循环血量根据患者身高、体重等而定, 采集外周血 35 ml, 单个核细胞数大约为 1×10^8 个, 采血袋酒精消毒后, 于传递窗送入细胞制备室 (百万级 GMP 标准试验间), 进行密度梯度离心, 无菌制备 PBMC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 ~ 4 h, 将悬浮细胞移出, 贴壁细胞中, 补充有 1 000 u/ml 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 1 000 u/ml IL-4 的培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中培养, 第 4 天补充上述细胞因子, 第 6 天加入携带多抗原 Ad5 型腺病毒, MOI=5, 负载 DC, 第 7 天加入 TNF- α , 负载 DC 成熟, 制备成 DC 疫苗。吸取悬浮细胞, 用含 INF-g 的 2% 自体血清的完全培养基悬浮, 调整细胞梯度至密度为 2×10^6 个 /ml, 接种于 75 cm² 培养瓶中, 24 h 后, 向培养液中加入 CD3 单抗、重组人 IL-2 及重组人 IL-1, 诱导生成大量 CIK 细胞, 每 2 天更换 1 次培养液, 培养 10 ~ 14 d 后, 根据细胞扩增情况, 收集 CIK 细胞并用生理盐水洗涤 2 次。然后将细胞悬浮于含有 20 g/L 人血清清蛋白的 100 ml

生理盐水中, 并静脉输注给患者, 细胞量每次 $< 1 \times 10^{10}$ 个, 活力 $< 95\%$, 每周回输 1 次共回输 3 次, 回输前对细胞培养液取样进行细菌、真菌、支原体和内毒素检测, 回输后以相同方法采集外周静脉血检测 Pro-GRP 和 T 淋巴细胞亚群。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用独立样本 *t* 检验, 生物治疗前后比较选用配对样本 *t* 检验, 相关性分析采用 Pearson 检验, 各组数据分别服从正态分布, 且方差齐性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pro-GRP、CEA、NSE 及 CYFRA21-1 在肺癌中的表达

Pro-GRP 在 SCLC 组中高表达, 有时甚至可高达 5 000 pg/ml, 对照组与 SCLC 组、NSCLC 与 SCLC 组间 Pro-GRP 水平比较差异有统计学意义 ($t = 3.304$ 和 -3.290 , $P = 0.006$), 对照组与 NSCLC 组 Pro-GRP 水平比较差异无统计学意义 ($t = -5.860$, $P = 0.052$); Pro-GRP 和 NSE 在 SCLC 组的表达高于 NSCLC 组, CYFRA21-1 在 NSCLC 组的表达高于 SCLC 组, CEA 在各组表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 DC-CIK 生物治疗前后 Pro-GRP、T 淋巴细胞亚群水平的比较

NSCLC 组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达增高, CD8⁺、Treg 细胞表达降低; 而 SCLC 组治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 表达增高。Treg 细胞表达降低; 两组治疗后的 Pro-GRP 水平与治疗前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 均低于治疗前。见表 2。

2.3 DC-CIK 生物治疗前后两组 T 淋巴细胞亚群的变化

DC-CIK 细胞生物治疗后 NSCLC 组 CD8⁺ 淋巴细胞和 Treg 细胞较治疗前降低, CD3⁺、CD4⁺ 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值较治疗前上升; SCLC 组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞数量较治疗前均增加, Treg 细胞两组均较治疗前降低。见图 1~5。

2.4 DC-CIK 生物治疗前后 Pro-GRP 与 T 淋巴细胞亚群相关性分析

SCLC 组 Pro-GRP 治疗前与 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、呈负相关, 与 Treg 细胞呈正相关, 治疗后也存在相关

表 1 各组肺癌患者血清肿瘤标志物检测水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Pro-GRP / (pg/ml)	CEA / (ng/ml)	NSE / (ng/ml)	CYFR21-1 / (ng/ml)
对照组 (n=40)	34.93 ± 16.08	2.93 ± 1.36	8.66 ± 2.08	1.57 ± 0.75
SCLC 组 (n=13)	1 943.71 ± 208.53 [†]	13.49 ± 2.76	80.83 ± 10.57 [†]	17.79 ± 4.36
NSCLC 组 (n=32)	47.69 ± 24.11	65.05 ± 19.51	17.79 ± 4.36	24.68 ± 6.47 [†]
F 值	31.320	2.480	15.675	3.123
P 值	0.001	0.091	0.001	0.049

注: † 与对照组比较, P < 0.05

表 2 DC-CIK 细胞治疗前后 Pro-GRP、T 淋巴细胞亚群水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD3 ⁺ / %	CD4 ⁺ / %	CD8 ⁺ / %	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Treg / %	Pro-GRP / (pg/ml)
NSCLC 组 (n=32)						
治疗前	59.6 ± 3.6	31.7 ± 2.8	27.3 ± 3.6	1.2 ± 0.2	15.0 ± 3.9	47.69 ± 24.11
治疗后	62.3 ± 3.8	35.8 ± 2.6	23.8 ± 1.9	1.5 ± 0.1	11.7 ± 4.0	37.13 ± 15.23
t 值	10.431	12.516	-3.109	7.120	-6.132	-3.915
P 值	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.032
SCLC 组 (n=13)						
治疗前	49.4 ± 12.1	25.8 ± 5.9	23.8 ± 6.2	1.1 ± 0.1	9.0 ± 1.2	1 943.71 ± 208.53
治疗后	59.2 ± 9.9	30.9 ± 5.4	28.4 ± 4.9	1.2 ± 0.1	7.6 ± 1.1	430.23 ± 67.14
t 值	4.699	5.198	3.951	1.213	-8.153	-3.911
P 值	0.001	0.001	0.002	0.041	0.001	0.001

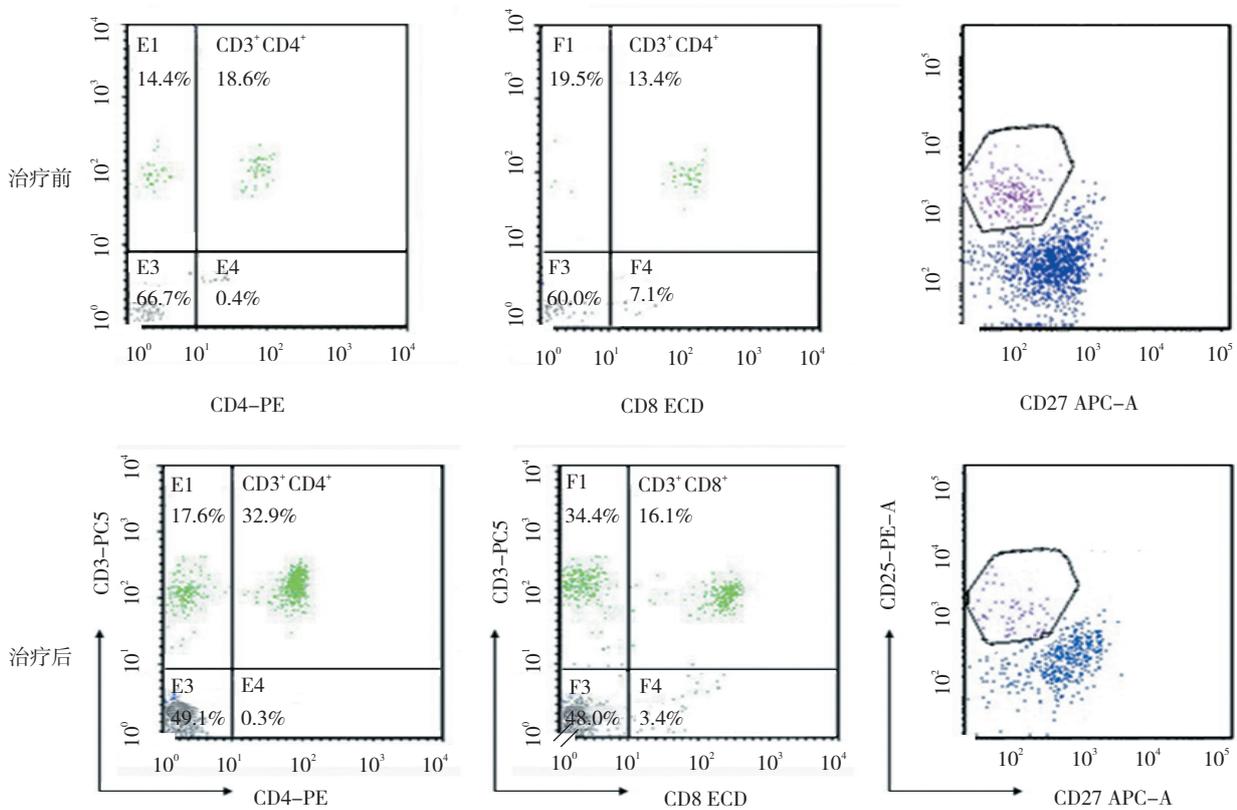


图 1 SCLC 组治疗前后 T 淋巴细胞亚群比较

性 ($P < 0.05$); 在 NSCLC 组 Pro-GRP 与 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 无相关, 只与 Treg 细胞呈正相关。见表 3。

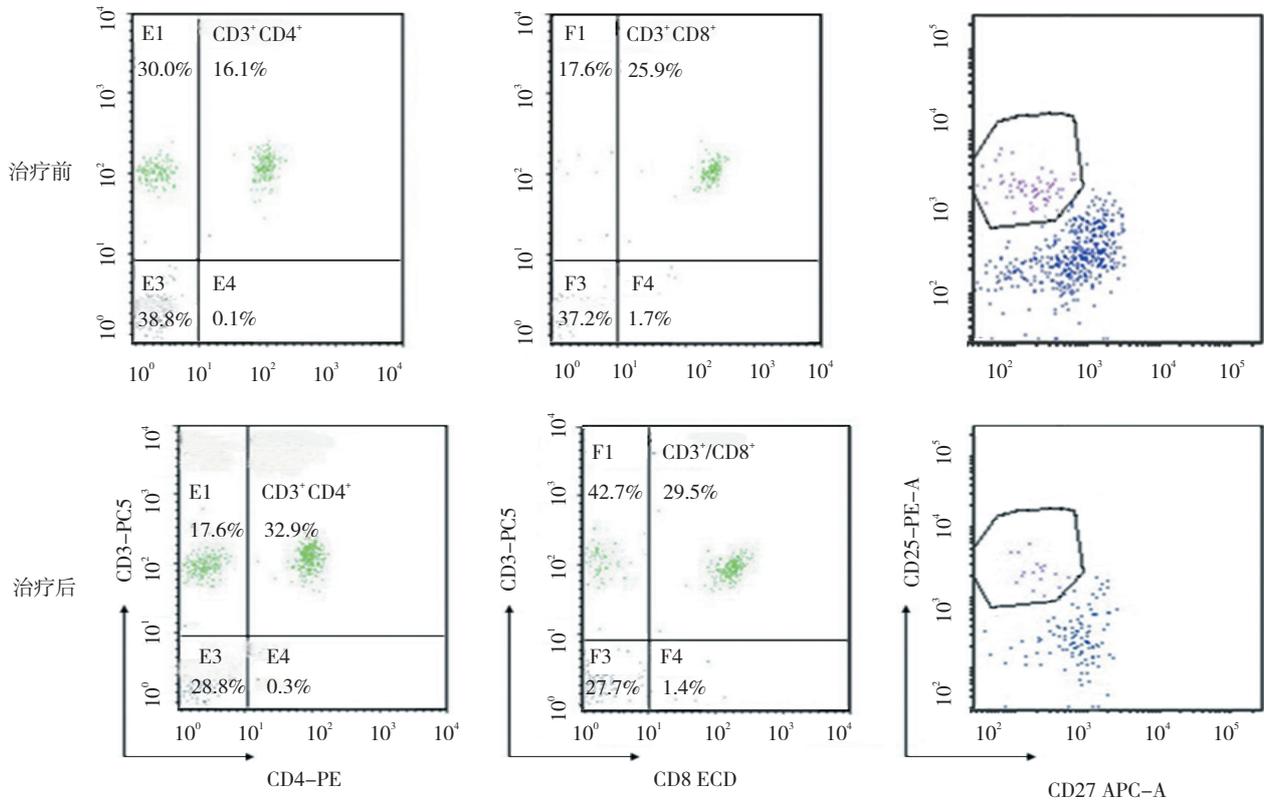


图 2 NSCLC 组治疗前后 T 淋巴细胞亚群比较

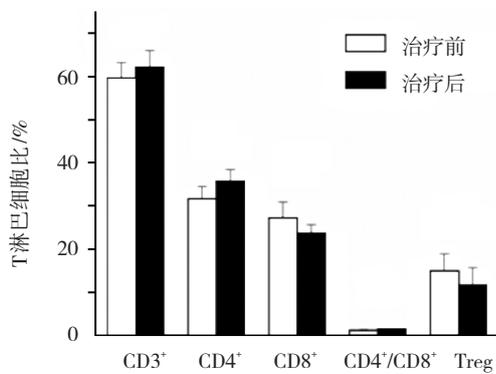


图 3 NSCLC 组治疗前后 T 淋巴细胞比

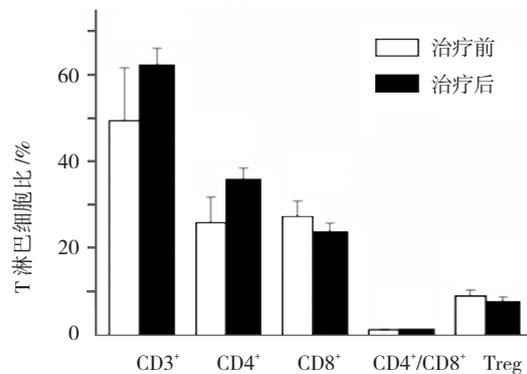


图 4 SCLC 组治疗前后 T 淋巴细胞比

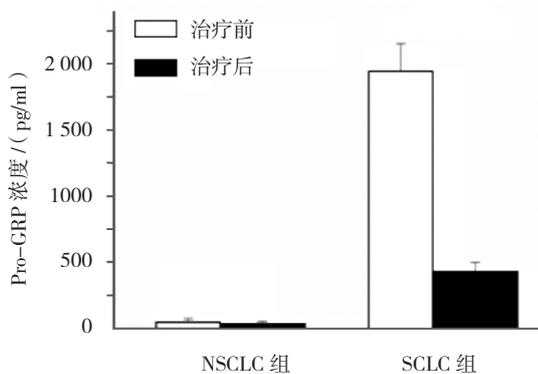


图 5 两组治疗前后 Pro-GR 水平比较

表 3 DC-CIK 生物治疗前后 Pro-GRP 与 T 淋巴细胞亚群相关系数

组别	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Treg
治疗前				
NSCLC 组	-0.31	-0.21	-0.24	0.92 [†]
SCLC 组	-0.94 [†]	-0.95 [†]	-0.92 [†]	0.84 [†]
治疗后				
NSCLC 组	-0.21	-0.34	-0.09	0.87 [†]
SCLC 组	-0.64 [†]	-0.63 [†]	-0.68 [†]	0.51 [†]

注: [†] $P < 0.05$

3 讨论

肺癌是一种原发于肺、气管及支气管的恶性肿瘤。恶性肿瘤患者普遍存在免疫功能低下,免疫细胞不能有效识别、排斥和杀灭肿瘤细胞,T淋巴细胞及亚群是机体关键性免疫活性细胞,在免疫监视、杀伤靶细胞及免疫调节方面具有极重要的作用^[3]。当肺癌患者T淋巴细胞及其亚群数量发生变化或CD4⁺/CD8⁺细胞比值异常时,可视为免疫调节功能紊乱。

CD3⁺细胞反映机体总的细胞免疫状态,一般为CD4⁺与CD8⁺细胞数之和。肺癌患者免疫功能紊乱或低下,细胞免疫功能处于抑制状态,CD3⁺细胞减低。本研究显示,DC-CIK细胞回输生物治疗后,患者体内的淋巴细胞亚群发生明显变化,CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺较治疗前上升,DC-CIK生物治疗增加IFN- γ 、IL-2细胞因子的分泌,促进CD4⁺的分化和增殖,CD4⁺淋巴细胞辅助诱导其他淋巴因子抑制肿瘤细胞增生^[4],分泌IL-2、IFN- γ 、TNF- β 等细胞因子杀伤肿瘤细胞,激活巨噬细胞、自然杀伤细胞抑制肿瘤基因表达,以达到抑制肿瘤病毒的繁殖,使肿瘤细胞生长停滞,诱导肿瘤细胞凋亡^[5]来调节机体其他免疫细胞的功能。本实验结果显示,NSCLC组SCLC组CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺治疗前后的比较,表达增高证明DC-CIK免疫治疗调节患者的免疫功能,提高患者的抗肿瘤免疫水平,恢复肺癌患者的免疫监视功能。

抑制T细胞CD8⁺通过分泌IL-4、IL-5、IL-10、IL-13等细胞因子,直接对抗原呈递细胞产生细胞毒效应,通过独特型网络抑制B细胞产生抗体^[6],本实验显示,NSCLC组CD8⁺细胞在生物治疗前后的比较结果下降,证明DC-CIK细胞抑制CD8⁺细胞的负向调节,CD8⁺细胞数量减少有利于抑制肿瘤持续增长^[7],但是在SCLC组CD8⁺在生物治疗后上升,两组比较有差异,可能原因CD8⁺细胞根据是否表达CD28分为毒性T细胞和抑制T细胞,前者具有细胞毒性功能,后者具有免疫抑制功能^[8],这使得CD8⁺细胞具有双相调节功能,两者的相互作用在NSCLC和SCLC表达有差异,并且SCLC肿瘤恶性程度较高,广泛浸润导致免疫监视功能停滞,T淋巴细胞已基本丧失免疫功能,无法快速恢复至正常水平,导致两者在CD8⁺细胞表达有差异,具体原因还需要进一步的研究。

当肿瘤发生免疫逃避时,Treg细胞通过分泌IL-6和IL-17细胞因子,诱导STAT3转录因子的活化,从而抑制CD4⁺和CD8⁺细胞及DC细胞的活化和增殖,

DC-CIK生物治疗前后NSCLC组与SCLC组Treg细胞较治疗前下降,说明DC-CIK生物治疗降低Treg细胞表达、逆转Treg细胞对肿瘤患者的免疫抑制作用,从而增强患者免疫识别和杀伤功能。

本研究采用电化学发光方法检测Pro-GRP,实验显示Pro-GRP和NSE在SCLC组高于NSCLC组,早期的实验报道证明Pro-GRP在SCLC组中具有高表达^[9],Pro-GRP对SCLC诊断的特异性和敏感性高于NSE^[10-11]。本实验也证明Pro-GRP可以作为一种特异的SCLC肿瘤标志物,在患者未经治疗前显示出较高的水平,治疗后呈现下降趋势,在SCLC组降低更加明显。SCLC组Pro-GRP治疗前与T淋巴细胞亚群呈负相关,与Treg细胞呈正相关,即Pro-GRP越高T淋巴细胞亚群数值越低,说明SCLC患者的Pro-GRP越高其免疫调节功能越差,免疫抑制越强,而在NSCLC组并无相关性,研究证明Pro-GRP可以作为SCLC患者免疫功能的临床评价指标,在治疗过程Pro-GRP的下降可以提示患者免疫功能变化,还需要扩大标本量,进行更進一步的研究。

综上所述,DC-CIK生物治疗增强患者特异性杀伤肿瘤的能力,提高机体的免疫监视功能,抑制肿瘤免疫逃逸,改善患者的免疫功能。DC-CIK生物治疗提高传统化疗肺癌患者的疗效,增强抗肿瘤效果^[12-15]。然而,DC-CIK疗法是目前不用于肺癌常规治疗,主要是因为细胞疗法需要个体化成本较高,因此,降低DC-CIK疗法的成本使其将来可提供给更多的患者。

参 考 文 献:

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] ZHONG R, HAN B, ZHONG H, et al. A prospective study of the efficacy of a combination of autologous dendritic cells, cytokine-induced killer cells, and chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. Tumour Biol, 2014, 35(2): 987-990.
- [3] MORI A, DEOLA S, XUMERLE L, et al. Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology[J]. Blood Res, 2013, 48(4): 242-249.
- [4] BRODERICK L, YOKOTA S J, REINEKE J, et al. Human CD4⁺ effector memory T cell persisting in the microenvironment of lung cancer xenografts are activated by local delivery of IL-12 to proliferate, produce IFN- γ , and eradicate tumor cells[J]. J Immunol, 2005, 174(2): 898-906.
- [5] KIN T Y, MYOUNG H L, KIM J H, et al. Both E7 and CpG-Oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized

- tumor cells; involvement of CD4⁺ and CD8⁺ T cell in protection[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24): 7234-7240.
- [6] KENNEDY R C, SHEARER M H, WATTS A M, et al. CD4⁺ tlymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 1040-1045.
- [7] KISSICK H T, SANDA M G, DUNN L K, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(27): 9887-9892.
- [8] FILACI G, FENOGLIO D, FRAVEGA M, et al. CD8⁺ CD28⁺ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers[J]. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4323-4334.
- [9] CUI Y, YANG X, ZHU W, et al. Immune response, clinical outcome and safety of dendritic cell vaccine in combination with cytokine-induced killed cell therapy in cancer patients[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2): 537-541.
- [10] MINEHIDO I, RYUJI H, AZUSA Y, et al. Plasma neuron-specific enolase level as a prognostic marker in patients with non-small cell lung cancer receiving gefitinib[J]. *Molecular and clinical oncology*, 2015, 3(4): 802-806.
- [11] MOLINA R, AUGÉ J M, BOSCH X, et al. Usefulness of serum tumor marker, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. *Tumour Biol*, 2009, 30(3): 121-129.
- [12] NISMAN B, BIRAN H, RAMU N, et al. The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(11): 4827-4832.
- [13] JIN C G, CHEN X Q, LI J, et al. Moderating effects and maintenance of lung cancer cellular immune functions by CIK cell therapy[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(6): 3587-3592.
- [14] LI R, WANG C, LIU L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: a phase II clinical study[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11): 2125-2133.
- [15] LI Z. Potential of human gammadelta T cells for immunotherapy of osteosarcoma[J]. *Mol Biol Rep* 2013, 40(1): 427-437.

(张西倩 编辑)