

TIL 的培养方法及研究进展

李雪, 罗华灶, 朱嗣博, 朱乃硕

(复旦大学 生命科学学院, 上海 200433)

摘要: TIL 是从肿瘤组织中分离出的浸润性淋巴细胞。1986 年 Rosenberg 研究组首先报道了在黑色素瘤患者的肿瘤组织中存在渗入性的淋巴细胞——TIL, 这些细胞从瘤体中分离并经 IL-2 激活后可大量扩增, 并对自身肿瘤有高度特异性杀伤活性。一般来说, TIL 中绝大多数细胞是 CD3⁺T 细胞, 不同肿瘤来源的 TIL 中, CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的比例也有所差异, 但大多数情况下以 CD8⁺T 细胞为主, 其属于肿瘤过继免疫治疗中的高效效应细胞, 其抗肿瘤效力相比 LAK 细胞强 50~100 倍。近年来, TIL 的生物学表型及功能研究有了较大发展, 这为 TIL 的临床应用带来了有利的价值, 但目前国内外依然没有统一的培养技术规范。因此文章就目前 TIL 的研究进展以及各大实验室关于 TIL 的培养技术经验做一简要总结, 以帮助基础科研及临床转化有效顺利地进行。

关键词: 肿瘤; 肿瘤浸润性淋巴细胞; 抗肿瘤

中图分类号: R392.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)02-0164-05

在肿瘤组织中, 有大量的肿瘤细胞和一些渗入在肿瘤组织里的淋巴细胞, 人们称之为 TIL, 1922 年 Mac Carty 推测淋巴细胞到肿瘤组织内是体内免疫系统抵抗肿瘤的一种现象, 提出了 TIL 是一种高效抗癌的免疫效应细胞^[1]。1986 年 Rosenberg 等^[2-5]从荷瘤小鼠肿瘤组织中发现并分离了 TIL, 并且研究团队在黑色素瘤相关动物模型和黑色素瘤患者的研究中发现, 将具有抗肿瘤活性的免疫细胞输入到患者体内, 能使高达 72% 的转移性黑色素瘤患者发生客观性肿瘤消退, 40% 的患者体内能保持长期持续性的抗肿瘤免疫反应。已发表的临床试验表明, 48% 的患者有较理想的客观反应率, 这是 TIL 用于过继性治疗取得成功的案例^[6-7]。TIL 一般来源于恶性胸腹水、实体瘤原发灶以及淋巴结转移组织^[3], 这些淋巴细胞从瘤体中分离并经 IL-2 刺激后, 可大量扩增, 体外细胞杀伤试验及体内回输患者相关临床试验再次证明, TIL 可有效发挥抗肿瘤作用^[8-9]。然而, TIL 的过继性免疫治疗虽然在黑色素瘤患者身上取得了较好的疗效, 国内外实验室也在积极开展相关研究, 但就培养方法而言, 依然存在很多技术壁垒。因此, 本文总结了各类肿瘤 TIL 的体外制备培养方法以及就

TIL 目前尚未解决的问题等作一简要综述。

1 TIL 表型及功能

TIL 以 T 细胞为主, 同时也包含 B 细胞和 NK 细胞, 表型以 CD4⁺、CD8⁺ 为主。也有 CD3⁺CD56⁻和 CD3⁻CD56⁺的细胞, 但在有些病例中 TIL 的表达异常。一般而言, TIL 经过 IL-2 刺激培养后, CD4⁺细胞减少, CD8⁺细胞增加, 但有些病例的 TIL 细胞培养后 CD4⁺细胞明显高于 CD8⁺细胞。例如, 有报道显示新鲜分离的肝癌 TIL 表型主要呈 CD3⁺, 占(62.7±15)%, CD8⁺(50.3±20)%, CD4⁺(46.8±11)%; 胃癌 CD3⁺(64.2±7)%, CD8⁺(56.6±8)%, CD4⁺(50.6±10)%; 肾癌 CD3⁺(68.1±9)%, CD8⁺(70.6±18)%, CD4⁺(42.3±4)%。体外培养扩增 20 d 后肝癌 TIL 表型呈 CD3⁺(72.8±17)%, CD8⁺(48.5±12)%, CD4⁺(51.4±15)%; 胃癌 CD3⁺(71.7±6)%, CD8⁺(30.4±11)%, CD4⁺(60.4±9)%; 肾癌 CD3⁺(80.1±17)%, CD8⁺(56±14)%, CD4⁺(38.2±12)%。因此, 随着体外扩增时间的延长其表型也出现了不同程度的变化^[10-11]。

目前, TIL 作为一种过继性治疗的免疫手段, 其回输的数量高达 1×10^{11} 数量级。体外扩增需要高剂量的 IL-2, 但 IL-2 过高会导致培养的 TIL 中 Treg 数量增加, 因此 IL-2 的剂量应控制在合适的

收稿日期: 2018-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(KRH1322424/004)

作者简介: 李雪(1990—), 女, 博士生, 主要从事分子免疫学研究

通信作者: 朱乃硕(E-mail: nzhu@fudan.edu.cn)

范围内。TIL抗肿瘤机制主要包括以下3种途径：(1)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细胞因子杀伤肿瘤细胞；(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^[12]。TIL细胞杀伤活性为LAK细胞的50~100倍，其分泌细胞因子GM-CSF、IFN- γ 、IL-2等，有向肿瘤部位定向聚集的特点，因此抗瘤活性较强^[13]。但从表型分析到功能研究相关的报道表明TIL原位功能有被抑制的可能，例如Akiyama等^[14]已证明抑制细胞在肿瘤制备液中的存在，TIL本身特别是CD8⁺细胞可能也有抑制性的影响^[15]，所以肿瘤微环境中肿瘤细胞或抑制细胞亚群产生的可溶性调节因子，或者肿瘤抗原本身也可产生抑制效应^[16-17]。因此TIL的过继性免疫治疗与抗体类药物或者与放、化疗联合使用治疗临床患者会产生更好的效果。但其医疗费用较高，以及培养方法的局限性制约了其在肿瘤治疗中的普及。例如，宝建中等^[18]介绍了成功培养TIL的方法，但培养扩增的细胞数量依然满足不了患者的输入量。Topalian等^[19]提出使用OKT3(抗CD3)抗体、IL-2以及经过辐照灭活后的健康供者的单个核细胞作为饲养细胞进行培养刺激。这一方法虽然可以使TIL的数量达到临床治疗的数量级，但也只是在大多数晚期黑色素瘤治疗的临床试验中被应用。

2 TIL的制备方法及疗效

2.1 肺癌恶性胸腹水TIL的分离扩增与治疗 无菌采集肺癌患者自身癌性胸水100 mL，用肝素抗凝(10 U/mL)，离心去掉上清液，得到细胞沉淀。加入20 mL Hanks溶液将细胞重悬。使用75%和100% Ficoll-Hypaque 密度梯度离心液，最下层为100%淋巴细胞分离液15 mL，中间为75%的淋巴细胞15 mL，在最上层小心沿着管壁加入20 mL细胞悬液，2 000 r/min、4℃离心20 min，收集75%与100% Ficoll-Hypaque之间的细胞悬液，即可获得TIL，再用RPMI 1640完全培养液反复洗涤3次。用含10%人AB血清和抗生素的RPMI 1640完全培养液将TIL密度调整为 1.0×10^6 个/mL并置于6孔板中，培养第1天加入终浓度为1 000 U/mL的

IFN- γ ；第2天加入终浓度为100 ng/mL的OKT3以及1 000 U/mL的IL-2；在5% CO_2 、37℃恒温箱中培养；培养1~2 d后补添含有1 000 U/mL IL-2、10%人AB血清和抗生素的RPMI 1640完全培养液继续培养^[13, 20]。

收获培养3~4周的TIL，用含1%人血白蛋白的NS 30~50 mL悬浮TIL，同时加50 000~100 000 U的IL-2，给患者进行自体TIL胸腔或腹腔内回注，在回注后10~30 d内，30例病例中有12例完全缓解(40.0%)、有效15例(50.0%)、无效3例(10.0%)，有3例患者肿瘤缩小，已存活6~8个月，另1例患者已存活一年以上^[21]。

2.2 黑色素瘤TIL的分离扩增与治疗 取恶性黑色素瘤新鲜样本，用Hanks溶液洗涤两次，剪成1 mm³碎片，加入含有0.1%胶原酶(Ⅳ型)、0.01%透明质酸酶、0.02% DNA酶的RPMI 1640培养液，磁力搅拌3~4 h。再使用70 μm 孔径过滤器过滤，在Hanks液中洗涤，经密度梯度离心后，吸取分离液界面上的细胞，将TIL密度调整为 2×10^6 个/mL，置于培养液中，37℃、5% CO_2 恒温箱中进行培养传代^[22-23]。培养过程中加入IL-2 6 000 IU/mL，完全培养液RPMI 1640包含10%人AB血清、25 mmol/L HEPES、10 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素，以及55 $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇培养2~3 d后更换培养液以及IL-2。培养10~18 d时，细胞可以从原来的 2×10^6 个/mL增加到 5×10^7 个/mL，TIL可一直扩增到21~36 d；同时也可以利用外周血进行辐照作为“滋养层细胞”或者完全培养液里加入抗CD3抗体和6 000 IU/mL IL-2，以快速大量扩增TIL，其有效率比原来的扩增方法提高3 000倍^[24]。TIL的局部注射次数，最高6次，最低2次。临床观察发现，在55例患者中，有23例患者其原发病灶和转移病灶均有不同程度的缩小。电镜及光镜下对照观察发现，比起未经TIL注射的肿瘤标本，经注射TIL的肿瘤标本中，可见到大量的坏死组织，肿瘤细胞表现出不同程度的溶解性坏死^[25]。

2.3 肾细胞癌TIL的分离扩增与治疗 手术切除癌组织，使用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的Hanks溶液清洗，近年来，除了传统的手工提取方法，国内外开始使用组织自动分离仪器(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, 德国)，将组织切成2~3 mm³大小，将3种酶(3 000 U/mL

DNase、10 mg/mL 胶原酶以及 10 mg/mL 的透明质酸酶)混合在 RPMI 1640 培养液中, 37 °C 下分离, 可参照仪器使用说明书进行。RPMI 1640 培养液包括 10% FCS、1% 谷氨酸、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、25 mmol/L HEPES 和 50 μ mol/L β -巯基乙醇, 将细胞以 0.5×10^6 个/mL 加入 6 000 或 3 000 IU/mL IL-2 重悬于 24 孔板里。每隔 2 d 换一次培养液和 IL-2, 7 d 后, 细胞可以扩增到 1×10^6 个/mL。为了激活 TIL, 扩增过程中 1×10^6 个/mL 细胞可以添加 30 ng/mL OKT3、30 ng/mL 抗 CD28 抗体。或者使用激活磁珠, 例如抗人 CD2 抗体, 抗人 CD3 抗体以及抗人 CD28 抗体(Miltenyi Biotec)。也可以使用 CD3/CD28 的偶联磁珠(Life Technologies), 并且这种磁珠在细胞培养 7 d 后就会消失^[26-27]。每例患者回输用量至少在 $3 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 个细胞之间。200 多例晚期肾癌患者中有 120 例接受了生物化疗, 总缓解率为 38%, 其中完全缓解 13 例(11%)、部分缓解 32 例(27%)。18 例部分缓解患者的肿瘤缩小了 90%, 完全缓解患者无瘤期为 7~8 个月^[28]。

2.4 肺癌 TIL 的分离扩增与治疗 根据 Ganesan 等^[29]的方法, 手术切除瘤组织, 无菌条件下去除坏死组织及结缔组织, PBS 冲洗两次。将组织剪碎, 使用胶原酶 P(Roche)在 37 °C 恒温箱里消化 20 min。再过 40 μ m 滤网收集单细胞悬液, 用含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液进行洗涤, 红细胞裂解液冰上裂解 10 min。在试管底部加比重为 1.077 g/mL 的 100% 淋巴细胞分离液, 其上加入等量用 RPMI 1640 培养液稀释的比重为 1.055 g/mL 的 75% 淋巴细胞分离液, 最上面一层加入等量细胞悬液, 400 \times g 离心 30 min, 在两个界面各出现环状物, 上环为肿瘤细胞, 下环为淋巴细胞, 轻轻吸取淋巴细胞, 用 Hanks 溶液洗两遍, 即为 TIL。使用含有人 10% AB 血清和抗菌素的 RPMI 1640 培养液, 加入 20% 正常人同血型 LAK 细胞培养上清, TIL 浓度为 1×10^6 个/mL, 再加入 IL-2 1 000 U/mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 根据细胞增殖情况, 3~5 d 换液传代一次, 补充新鲜培养液及 IL-2 等。TIL 的扩增还可以联合应用 CD3 单抗和 IL-2。GM-CSF 及 IL-4、IFN- γ 同基因混合淋巴细胞、自体肿瘤细胞或其上清等均可使 TIL 扩增能力和抗肿瘤活性增强^[30-31]。在此 34 例患者 TIL 培养过程中, 能达到 10^9 个以上的有 17 例, 可回

输率为 50%。其中鳞癌 7 例、腺癌 9 例、小细胞肺癌 1 例; I 期 6 例、II 期 1 例、III A 期 7 例、IV 期 3 例。17 例中 16 例在 32 d 内达 10^9 个, 11 例 TIL 扩增达 20 倍以上。Schwartzentruber 等^[32]对 6 例原发性肺癌进行了 TIL 治疗, 扩增的 TIL 总计 $5 \times 10^8 \sim 4.8 \times 10^9$ 个, 患者耐受良好, 其中 4 例显示肿瘤缩小。作者提出每位患者需要超过 1×10^{10} 个 TIL 才能产生较好效果, 如果联合使用 IL-2 疗效会更显著^[33-34]。

2.5 肝癌 TIL 的分离扩增与治疗 手术切除无菌新鲜肿瘤旁组织, 剔除周围的血块、脂肪及坏死组织, PBS 清洗一遍, 剪成 1 mm³ 大小, 浸入 0.1 μ g/mL 的 IV 型胶原酶(Sigma-Aldrich)中, 37 °C 水浴消化 2 h。用 100 μ m 孔径的网筛过滤, 用 PBS 冲洗组织块, 收集滤液。室温下离心, 1 500 r/min 离心 5 min。弃上清, 加入 1 mL 的 PBS 制成少量细胞悬液后, 用淋巴细胞分离液作不连续密度梯度离心。离心后收取下层界面的淋巴细胞, 经 PBS 清洗后, 按 1×10^6 个/mL 的浓度悬浮于含 10% 人 AB 型血清和 rIL-2(2 000 IU/mL)的 X-VI-VO-15 培养液中, 接种于 12 孔板上, 3 mL/孔。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 每 3~5 d 换一次液。当孔里的淋巴细胞生长至 1×10^7 个时, 将其转入含有 30 ng/mL 的抗 CD3 单抗、30 ng/mL 的抗 CD28 单抗和 1×10^8 个同种异体的经辐照灭活的健康供者 PBMC 的培养瓶内。健康供者 PBMC 的辐射剂量是 180 Gy。刺激后的第 2 天加入 IL-2, 并调整其在培养液中的浓度为 4 000 IU/mL, 于 CO₂ 培养箱中培养。培养过程中每隔 2~3 d 半量更换含同等浓度 IL-2 的新鲜培养液, 培养 22~25 d 后收集体外扩增的 TIL^[35-36]。

2.6 胃癌 TIL 的分离扩增与治疗 取新鲜胃癌手术标本(10 g 以下), Hanks 液洗 3 次, 去除周围脂肪、血块等, 剪成约 1 mm³ 大小, 浸泡在 Hanks 溶液里。以 RPMI 1640 为基础液, 含 I 型透明质酸酶 30 mg、I 型 DNA 酶 6 mg、VI 型胶原酶 50 mg (均为 Sigma-Aldrich 公司产品), 青霉素 20 000 U, 链霉素 20 000 U, 庆大霉素 8 000 U, 在 37 °C 下消化 12 h。过 200 目细胞筛, 收集悬液。取比重 1.077(100%)分离液 3 mL 于沉淀管底部, 再慢慢重叠加入比重 1.055(75%)分离液 3 mL。将细胞悬液 3~4 mL 置于比重 1.055(75%)分离液上面, 400 \times g 离心 30 min, 即可获得 TIL 和胃癌细胞。

使用12孔板,每孔 1×10^5 个,使用6 000 IU/mL的IL-2进行扩增培养,培养过程中每隔2 d更换含同等浓度IL-2的新鲜培养液,培养15 d后收集体外扩增的TIL^[37-38]。TIL达到治疗量后,给患者进行自体回输,一般5~7次,同时使用rIL-2(TIL用量在 $3.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 个之间,rIL-2为300 000 IU左右)。有报道显示,10例对照组存活时间最长为9个月,最短4.5个月,TIL组13例,除1例死亡外,其余均存活,生存1年以上的有7例,最长者已达20个月,1年以上生存率53.85%^[39]。

综上,以上6种癌症TIL的分离首先都需要在胶原酶的作用下消化成单细胞悬液,消化时间一般为0.5~4 h,或4℃过夜;使用Ficoll密度梯度离心液配比100%和75%的浓度,缓慢加入消化好的单细胞悬液,使用百叶状离心转子离心,而后轻轻吸取目的细胞;扩增培养一般将TIL浓度调整为 1×10^6 个/mL,使用1 000~6 000 U/mL IL-2进行培养。观察细胞生长状况,随后可加入CD3和CD28抗体等进行扩增培养。

3 TIL的研究趋势

3.1 TIL的基因导入 由于TIL具有一定的肿瘤定向聚集能力,将抗肿瘤细胞因子或MHC的基因导入TIL,既增强了TIL对肿瘤的特异性识别能力,又可使TIL在肿瘤部位分泌抗肿瘤细胞因子,从而发挥双重抗肿瘤效果。1990年Rosenberg等^[8]报道以反转录病毒作为载体,将新霉素耐药基因转入TIL并回输人体,此种作法对人体不产生毒副作用,不影响TIL的抗肿瘤活性,且有基因表达能力。在此基础上,有人将TNF的基因导入TIL,并证实了其有TNF分泌功能,其他细胞因子如IFN、IL-2的基因导入也正在研究过程中。这项技术将为TIL的过继免疫治疗提供一条大有潜力的途径^[40]。

3.2 TIL的过继免疫治疗 近年来临床上进行TIL过继治疗,一般对患者进行全身放疗,使患者体内的淋巴细胞被清除,同时联合化疗药物治疗可以提高疗效,但这往往给患者带来较大的副作用。2016年研究者在《自然-医药》杂志上发表文章,即通过PD-1和4-1BB作为肿瘤标志物从黑色素瘤患者外周血细胞库筛选肿瘤变异新抗原的活性杀伤性T细胞,体外进行激活、扩增回输进病人体

内,可以有效地达到清除肿瘤的目的^[41]。此外,肿瘤疫苗、单克隆抗体、细胞因子等也可以与TIL过继治疗联合使用。

3.3 TIL单细胞水平的研究 通过单细胞测序技术揭示肿瘤微环境中针对T细胞功能障碍的表型特征和临床意义,揭示表观遗传学和代谢改变是导致肿瘤微环境中T细胞功能障碍的重要机制,并提出逆转肿瘤微环境T细胞功能障碍的新方法。Zemin Zhang团队^[42]近期在《细胞》杂志上发表的在单细胞水平上对肝癌肿瘤微环境中T淋巴细胞的转录组及TCR序列进行综合分析,基于生物信息学分析,通过对T细胞进行亚群分类、发展轨迹分析及比较不同亚群中T细胞克隆的分布,来探索不同亚群之间的关系并鉴定每个亚群特异的基因表达,从而揭示肿瘤中T细胞在功能、分布和发展状态等方面的独特性质。肿瘤在免疫系统出现逃逸的主要原因包括杀伤性CD8⁺T细胞的功能紊乱及抑制性T细胞的大量存在,针对这两类细胞寻找靶点是免疫疗法的主要方向。此项工作着重探索了肿瘤中这两类细胞的特异表达基因,发现基因*Layilin*在这两群细胞中均特异性表达,并通过体外试验证明该基因对于CD8⁺T细胞的杀伤功能有抑制调节作用,可能作为免疫疗法的新靶点。同时,基于TCR数据分析,研究发现肝癌内存在大量肿瘤组织特异的克隆增殖的T细胞,但是这些细胞大多处于耗竭状态,从而揭示了肿瘤细胞逃逸免疫监视的原因。此外,研究还描绘了初始T细胞向耗竭状态的发展轨迹,并在耗竭CD8⁺T细胞亚群中发现了一类Foxp3⁺Treg的存在,提出了耗竭T细胞会进一步发展成Treg的潜在发展方向。

4 结语

TIL作为过继性免疫治疗的方法之一,对恶性肿瘤的治疗有着广泛的应用前景。由于来自自体瘤内,所以抗肿瘤的特异性强,不存在排斥反应,体外可以大量培养。但是TIL临床过继细胞治疗中仍然存在一些问题:(1)回输的TIL无法完全去除Treg,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。(2)回输的TIL经血液循环后存在数量较少。(3)联合治疗费用昂贵,在普通患者中难以普及。目前,在肿瘤免疫中,阻断免疫检查点抑制剂PD-1、PD-L1、CTLA-4的临床免疫疗法只在少数癌症患者中有疗

效^[43],说明肿瘤微环境中存在着异质性和复杂性,因此,TIL值得研究者去分析研究。而近两年来兴起的CAR-T技术识别肿瘤抗原是以HLA非依赖的方式,这使得该技术可以突破患者HLA分型的限制。CAR改造的T细胞可以针对任何细胞表面抗原,因此CAR改造的T细胞相较于天然T细胞表面受体能够识别更广泛的目标。而TIL免疫治疗可以与放化疗一起在肿瘤治疗中起着协同作用,但是TIL仍然以实验阶段为主,缺乏长期的临床观察,对其作用机制、表型、MHC影响等需要进一步研究。

参考文献

- [1] 宋占红,张阳,蔡玉文. 肿瘤浸润淋巴细胞[J]. 解剖科学进展, 2003, 9(1): 65-66.
- [2] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R, *et al.* A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes [J]. Science, 1986, 233 (4770): 1318-1319.
- [3] Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma[J]. N Engl J Med, 1988, 319: 1676-1680.
- [4] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 4550-4557.
- [5] Muul LM, Spiess PJ, Director EP, *et al.* Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma [J]. J Immunol, 1987, 138(3): 989-995.
- [6] Orit I, Einat H, Yaara Z, *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.
- [7] Michal JB, Ronnie SF, Avraham J, *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): 2646-2655.
- [8] Simon T, Rosenberg SA. Immunotherapy of metastatic solid cancers[J]. Adv Surg, 2011, 45: 341-360.
- [9] Christopher AK, Luca G, Douglas CP, *et al.* Determinants of successful CD8⁺ T cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice[J]. Cancer Res, 2011, 17(16): 5343-5352.
- [10] 王建华,童善庆,蒋玖,等. 卵巢癌肿瘤浸润淋巴细胞某些细胞因子基因表达的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6(1): 39-44.
- [11] 黄志勇,陈孝平,吴在德,等. 抗CD3 McAb和IL-2培养的肝癌TIL的表型变化[J]. 肝胆外科杂志, 1999(1): 63-64.
- [12] Gooden MJM, Bock GHD, Leffers N, *et al.* The prognostic influence of tumour infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2011, 105: 93-103.
- [13] 张红宇. 肺癌胸水肿瘤浸润淋巴细胞的生物学活性研究及临床应用[D]. 苏州: 苏州大学, 2003: 18-19.
- [14] Akiyama M, Bean MA, Sadamoto K, *et al.* Suppression of the responsiveness of lymphocytes from cancer patients triggered by co-culture with autologous tumor-derived cells[J]. J Immunol, 1983, 131(6): 3085-3090.
- [15] Meromit S, Chao W, Le C, *et al.* A distinct gene module for dysfunction uncoupled from activation in tumor infiltrating T cells[J]. Cell, 2016, 166(6): 1500.
- [16] Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, *et al.* Escape of human solid tumors from T cell recognition: Molecular mechanisms and functional significance[J]. Adv Immunol, 2000, 74: 181-273.
- [17] Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, *et al.* IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3447-3453.
- [18] 宝建中,王一,詹洲,等. 人肿瘤浸润淋巴细胞的体外抗瘤活性及其表型特征[J]. 中华实验外科杂志, 1995, 12(3): 147-148.
- [19] Topalian SL, Muul LM, Solomon D, *et al.* Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials[J]. J Immunol Methods, 1987, 102(1): 127-141.
- [20] 邹征云,刘宝瑞,杜鹃,等. 一种分离自体肿瘤细胞与TIL细胞新方法的建立[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(2): 153-157.
- [21] 陈建清,曾道林,康美玲,等. TIL细胞治疗恶性胸水的疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2011(1): 56-57.
- [22] Bianca H, Ke L. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2[J]. Hum Gene Ther, 2008, 19(5): 496-510.
- [23] Rosenberg SA. IL-2: The first effective immunotherapy for human cancer[J]. J Immunol, 2014, 192: 5451-5458.
- [24] 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.
- [25] Dudley ME, Gross CA, Langan MM, *et al.* CD8⁺ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16 (24): 6122-6131.
- [26] Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, *et al.* Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2015, 112(9): 1510-1518.
- [27] Andersen R, Donia M, Westergaard MC, *et al.* Tumor infiltrating lymphocyte therapy for ovarian cancer and renal cell carcinoma[J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(12): 2790-2795.
- [28] Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, *et al.* Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2015, 112: 1510-1518.

(下转第173页)