基于肿瘤浸润淋巴细胞的过继细胞疗法在膀胱癌中的研究进展*

黄前浩[1] 黄玉山[2] 张智涌[1] 宋帅帅[1] 王涛[1] 陈跃东[1,3]

［摘要］ 在过去的几十年里，免疫疗法一直是癌症研究的焦点。其中，过继细胞疗法(adoptive cell therapy，ACT)成为治疗各种实体肿瘤的前景，尤其是肿瘤浸润淋巴细胞的过继细胞疗法(tumor-infiltrating lymphocytes-adoptive cell therapy，TIL-ACT)。因为肿瘤浸润性淋巴细胞可通过不同细胞之间的相互作用影响肿瘤微环境(tumor microenvironment，TME)，从而影响肿瘤的发生和发展，并直接或间接发挥抗肿瘤作用。如 TIL-ACT 已经显示出对转移性黑色素瘤具有良好的抗肿瘤效应。目前，TIL-ACT 在膀胱癌中逐渐得到广大研究者的关注和喜爱，也有了一些初步进展，如一些动物实验和临床研究均表明 TIL-ACT 疗法在非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer，NMIBC)起到一定的抑制肿瘤发生和发展作用，在肌层浸润膀胱癌和转移性膀胱癌中也起到抑制癌症进展、治疗反应的预测指标作用和预后标志物作用。总之，本文综述了 TIL-ACT 在膀胱癌的研究进展、挑战和未来的发展方向。

［关键词］ 肿瘤浸润淋巴细胞；免疫治疗；膀胱癌；预后；肿瘤微环境
DOI：10.13201/j.issn.1001-1420.2024.09.007
［中图分类号］ R373.14 ［文献标志码］ A

Progress of tumour-infiltrating lymphocytes-based adoptive cell therapy in bladder cancer

HUANG Qianhao[1] *HUANG Yushan*[2] *ZHANG Zhiyong*[1] *SONG Shuaishuai*[1] *WANG Tao*[1] *CHEN Yuedong*[1,3]

([1]Key Laboratory of Urinary Tract Tumors and Calculi, Department of Urology, First Affiliated Hospital of Xiamen University School of Medicine, Xiamen, Fujian, 361003, China; [2]Department of Urology, Anxi County Hospital of Traditional Chinese Medicine; [3]Clinical College of Fujian Medical University)

Corresponding author: CHEN Yuedong, E-mail: chenyuedong8@126.com

Abstract Over the past few decades, immunotherapy has been a prominent area of focus within the field of cancer research. Among the various forms of immunotherapy, adoptive cell therapy (ACT) has shown some promise in the treatment of a range of solid tumours, especially tumour-infiltrating lymphocytes-adoptive cell therapy(TIL-ACT). It is thought that tumour-infiltrating lymphocytes may be able to affect the tumour microenvironment(TME) through interactions among different cells, which could influence tumour genesis and development and exert anti-tumour effects directly or indirectly. There is evidence to suggest that TIL-ACT is an effective approach to metastatic melanoma. It seems that TIL-ACT is gradually gaining the attention and popularity of researchers in bladder cancer, and some preliminary progress has been made. Some animal experiments and clinical studies indicate that TIL-ACT may play a role in inhibiting tumour development and progression in non-muscle invasive bladder cancer(NMIBC), as well as in muscle-invasive and metastatic bladder cancer. In addition, it has been demonstrated to predict treatment response and act as a prognostic marker. This paper reviews the advances, challenges and future directions for the development of TIL-ACT in bladder cancer.

Key words tumour-infiltrating lymphocytes; immunotherapy; bladder cancer; prognosis; tumour microenvironment

*基金项目：福建省医学创新课题(No:2020CXB046)；福建省科技计划项目(No:2022J011353)；泉州市 2021 年医疗卫生领域指导性科技计划项目(No:008)
[1]厦门大学医学院附属第一医院泌尿外科 尿路肿瘤与结石重点实验室(福建厦门，361003)
[2]安溪县中医院泌尿外科
[3]福建医科大学临床医学院
通信作者：陈跃东，E-mail:chenyuedong8@126.com

引用本文：黄前浩，黄玉山，张智涌，等.基于肿瘤浸润淋巴细胞的过继细胞疗法在膀胱癌中的研究进展[J].临床泌尿外科杂志，2024，39(9)：789-796. DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2024.09.007.

近年来，膀胱癌（bladder cancer，BCa）已经成为全球第 10 大最常见的癌症，死亡率显著升高。据估计，男性的发病率是女性的 4 倍左右[1]。尽管在某些地区的发病率和死亡率有所降低，但在全世界范围内其总体发病率和死亡率仍在增加。因此从临床和公共卫生的角度来看，BCa 仍然是一个重大问题。近 75％的 BCa 患者表现为局限于黏膜［Ta 期、原位癌（CIS）］或黏膜下层（T1 期）的非肌层浸润性膀胱癌（non-muscle invasive bladder cancer，NMIBC），这一比例在年轻患者中更高[2]。NMIBC 的标准治疗术式为经尿道膀胱肿瘤电切术（transurethral resection of bladder tumor，TURBT），但约 50％的患者在初次切除后 3 年内出现疾病复发，甚至进展[3]。因此，有研究者提出，应采用一些局部的膀胱内治疗或全身的辅助治疗，如化疗药物或更常见的卡介苗（bacillus Calmette-Guérin vaccine，BCG）[4]。目前，这些辅助治疗已经应用到临床，并取得了部分疗效。然而，仍有相当一部分患者对这种辅助治疗效果欠佳或没有反应，进而导致癌症复发或进展为肌层浸润性膀胱癌（muscle invasive bladder cancer，MIBC）[5]。一般来说，对于非常高风险的 NMIBC 患者，早期就可以进行更积极的根治性膀胱切除术（radical cystectomy，RC）治疗。

1959 年，Old 等[6]首次报道了 BCG 可防止动物模型中肿瘤的生长，并于 1976 年首次用于人类。随着对 BCG 的研究不断发展，目前“膀胱内注射 BCG”的免疫疗法被认为是 NMIBC 的必要治疗。也有研究者认为，虽然膀胱内注射 BCG 对部分患者显示出良好的预期效果，但仍有 20％～45％的高危 NMIBC 患者会进展为 MIBC[7]。在过去十年中，由于制造短缺，BCG 的供应也变得越来越有限。因此，对于初治 BCG、BCG 匮乏地区和 BCG 失败的患者，显然需要一种或多种新的替代疗法。

BCa 的全身辅助治疗方法有许多，如目前 MIBC 的标准治疗是基于顺铂的新辅助化疗（neoadjuvant chemotherapy，NAC），然后再进行 RC，以及术后的放化疗。对于病情较晚期的 MIBC 患者，还可以采用含铂药物的姑息性联合化疗，或采用帕博利珠单抗或阿替利珠单抗的姑息性免疫治疗。而对于不适合/不敏感顺铂的 MIBC 患者，可以在 RC 前进行免疫检查点抑制剂疗法的新辅助治疗。最近，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）已批准靶向程序性细胞死亡蛋白 1 和程序性死亡配体 1 的全身免疫检查点抑制剂疗法用于治疗“BCG 无反应膀胱原位癌”患者以及既往接受过或不适合顺铂化疗的晚期 BCa 患者[7-8]。虽然免疫检查点抑制剂的应用大大地扩展了辅助治疗的选择。但 BCa 患者对免疫检查点抑制剂的客观治疗反应仍低于预期，在所有铂类预处理的晚期 BCa 病例中，客观反应率仅在 16％～25％之间[9]。其低客观治疗率和高复发率凸显了 BCa 管理的临床缺陷，需要新的方法来获得持久的疗效。采用肿瘤浸润淋巴细胞的细胞过继疗法（tumour-infiltrating lymphocytes-adoptive cell transfer therapy，TIL-ACT）是一种治疗实体肿瘤的个性化免疫治疗方法。目前，TIL-ACT 已被证明会达到几种癌症客观上的肿瘤消退，包括黑色素瘤、宫颈鳞状细胞癌和胆管癌[6-7]。与黑色素瘤类似，BCa 已被证明是一种免疫原性肿瘤类型，是所有癌症类型中肿瘤突变负荷最高的癌症之一[10]。研究发现，BCa 肿瘤微环境（tumour microenvironment，TME）中的 CD8 阳性的 T 细胞浸润水平的增加与 BCa 患者生存率的提高有关[8]。此外，TIL 在 TME 与肿瘤之间存在某种关联，可以起到传递信息的作用，进而产生一定的抗肿瘤效应。值得注意的是，不同类型和亚群的 TIL，作用也是大不相同。目前发现其各种亚群的位置、聚类、相互作用和共刺激是成功的抗肿瘤免疫反应所必需的，在 TME 中起着重要的抗肿瘤作用。鉴于这些特征，TIL-ACT 或许能治疗局限性和转移性 BCa。本文将概述 TIL 在 BCa 中的应用现状，重点介绍 TIL 的制备过程、预后的判断和单独或者联合治疗的应用。

1 免疫治疗在 BCa 治疗中的作用与地位

BCa 的发病率一直居高不下，5 年总生存率低至 8％，目前仍是一个比较大的流行病问题。BCG 是最早用于 BCa 的免疫治疗方法，可追溯于 40 余年前。随着 BCG 的不断发展，逐渐证明其在动物和人体方面均起到良好的疗效。直至 1990 年，FDA 批准使用膀胱内 BCG 滴注用于 NMIBC 的治疗。2002 年的一项荟萃分析得出结论，BCG 不仅可减少 NMIBC 的复发，甚至还可以减缓 MIBC 的进展[11]。目前，BCG 维持治疗已经被纳入高危性 NMIBC 和部分 MIBC 的治疗指南。最近临床上也出现了许多新型的免疫治疗策略，如 Toll 样受体激动剂（Toll-like receptors，TLR），其在许多先天免疫细胞上表达，包括在桥接先天性和适应性反应方面起着关键作用的树突状细胞，TLR 也存在于大部分膀胱肿瘤中[12]。因此，TLR 激动剂和其他先天免疫系统兴奋剂有望作为启动抗肿瘤反应的佐剂，但可能需要与其他疗法联合使用。近期比较突出的新型免疫治疗策略就是免疫检查点抑制剂疗法，其在肌层浸润性 BCa 和转移性 BCa 中起到一定的疗效。目前，研究者们已考虑将其用于 MIBC 的新辅助或辅助治疗。

BCa 的治疗是依据不同分期和不同风险来决定的，根据肿瘤浸润膀胱深层的程度，相应地划分为 NMIBC 或 MIBC 和低危险、中危险、高危险和极高危险的非 NMIBC 或 MIBC。根据欧洲泌尿科

医师协会（European Association of Urologists，EAU）指南，低危的 NMIBC 患者仅采用 TURBT 治疗，这种手术方式具有足够的手术切缘和深度，可以切除所有可见的肿瘤。指南也建议在 TURBT 术后进行单次膀胱内化疗药物滴注（如丝裂霉素、表柔比星或吉西他滨）[13]。既往研究也显示，对于 NMIBC 患者应在 TURBT 术后加上膀胱内局部免疫治疗，最常用的药物就是 BCG。但并不是所有患者都对 BCG 有良好的反应，部分 BCa 患者可能存在对 BCG 不敏感、BCG 不耐受和 BCG 治疗后复发。这些患者并不能从局部滴注 BCG 中获益，复发和进展的风险也较高。对于这些患者，指南强烈建议进一步行 RC 或尝试重复使用 BCG、BCG 加干扰素 α2a 和吉西他滨或多柔比星等进行姑息性膀胱内局部治疗[14]。对于高危和极高危 NMIBC 患者，早期进行 RC 可以在一定程度上提高患者的生存率，辅助化疗与 NAC 也被认为是必要的选择[15]。如，与单纯手术治疗相比，基于顺铂的新辅助联合化疗使 MIBC 患者的 5 年总生存期得到一定改善[16]。尽管 NAC 对 MIBC 有益，但其仍未得到临床医生的充分利用。目前，多种限制因素使得约 50％的 MIBC 患者不适合接受基于顺铂的辅助治疗[17]。总之，到目前为止，尚没有足够的研究来比较辅助化疗与 NAC。

针对上述问题，有研究者提出检查点抑制剂疗法或许是一种可取的替代选择。目前，检查点抑制剂免疫疗法在转移性 BCa 中展现出部分积极性，目前已考虑将其用于肌层浸润性疾病的新辅助或辅助治疗。如，CheckMate 274 试验研究了纳武利尤单抗的辅助治疗，结果发现无论既往是否接受过 NAC，纳武利尤单抗组的无复发生存时间提高了 20 个月，而安慰剂组则提高了 10 个月[18]。另一项研究使用阿替利珠单抗和帕博利珠单抗联合治疗的Ⅰ/Ⅱ期研究结果显示，约 33％的 MIBC 患者出现完全的病理缓解[19]。ABACUS Ⅱ期试验（NCT02662309）招募了 95 例 MIBC 患者，他们在 RC 之前接受了 2 个周期的阿替利珠单抗治疗，在 91％的患者中观察到病理完全缓解[20]。PURE-01 的Ⅱ期研究（NCT02736266）纳入了 50 例患者，这些患者在 RC 前 3 个周期每 3 周给予帕博利珠单抗 200 mg，持续 3 个周期[18]，结果显示 42％的患者达到病理完全缓解。值得注意的是，上述研究发现对于 PD-L1 阳性的 MIBC 患者，帕博利珠单抗显示出更良好的疗效。此外，KEYNOTE 905/EV-303、NCT03924895 也启动了一项围手术期帕博利珠单抗单药治疗试验，该试验最近进行了修订，联合或不联合维汀-恩弗妥单抗治疗顺铂不敏感或无效患者[13]，但结果尚未公示，尚不清楚其联合用药的具体疗效。因此，在所有阶段的 BCa 管理中迫切需要为患有高危局限性、局部晚期和转移性疾病的 BCa 患者确定新型的有效治疗策略。

2　TIL 疗法在 BCa 治疗中的临床应用研究现状

2.1　TIL 疗法治疗流程

近年来，随着研究者们对 BCa 的免疫病理机制和 TME 的深入了解，免疫疗法正在成为 BCa 患者的一种新的治疗选择[21-22]。肿瘤浸润淋巴细胞是肿瘤组织中一种特殊类型的淋巴细胞，包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等。研究人员发现肿瘤基质的 TIL 可以通过分泌细胞因子在不同细胞之间传递信息作用于 TME，从而影响肿瘤的发生和发展，并直接或间接发挥抗肿瘤作用[23]。TIL 还建立了一个复杂的细胞间相互作用网络，有助于维持免疫因子抑制微环境，促进免疫逃逸并触发肿瘤。总之，肿瘤浸润淋巴细胞与癌症免疫调节和 TME 相关，在肿瘤发生、发展、转移和预后中发挥重要作用。

由于 TIL-ACT 在转移性黑色素瘤、宫颈癌、结直肠癌、卵巢癌和乳腺癌患者中显示出令人印象深刻的效果，全球范围内越来越多的临床中心在进行实体瘤的 TIL-ACT 试验[24]。值得注意的是，TIL-ACT 在一定程度上也适用于 BCa，并取得了一定的疗效。简单来说，TIL 的产生可以分为 2 个步骤：快速扩增前程序（pre-rapid expansion protocol，pre-REP）和 14 d 的快速扩增程序（rapid expansion protocol，REP）的大规模扩增。具体来说，医生首先通过手术获得适当大小和新鲜的肿瘤组织。然后，将 TIL 从肿瘤片段中解离或移出并进行初步的扩增，即通过酶消化、物理解聚或细针抽吸将肿瘤组织切割成碎片或制成单细胞悬浮液[25]，然后将肿瘤片段或单细胞悬液在含有 IL-2 的完全培养基中培养。需要注意的是，肿瘤位置可能会影响 TIL 的产生。从复杂的 TME 中筛选出有效的 TIL（具有抗肿瘤活性的效应 T 细胞）是一个困难的过程。目前主要是通过效应 T 细胞的表面标志物来进行筛选，包括 CD8、CD4、CD103 和 CD39 等标志物。TIL 治疗很大程度上取决于对特定肿瘤抗原的准确识别。如，$CD8^+$ TIL 在免疫反应中起关键作用，它们可以特异性识别和杀死肿瘤细胞，输注大量 $CD8^+$ TIL 与客观的临床反应密切相关[26]。此外，Ahmadzadeh 等[27]报道指出，PD1 阳性 $CD8^+$ TIL 比 PD1 阴性 $CD8^+$ TIL 更容易分离肿瘤特异性 TIL，这解决了筛选数百个 T 淋巴细胞克隆获得肿瘤特异性 TIL 的问题。值得注意的是，加入抗 PD-1、抗 41BB 或抗 CTLA-4、IL-2 和 CD3 的激发抗体进行联合培养能显著增强 TIL 的扩增。如，Aydin 等[26]通过添加激动剂 4-1BB 抗体优化了原发性膀胱肿瘤中 TIL 的扩增，为 BCa 的治疗奠定了基础。当获得足够数量的初始 TIL

后,需要立即将其冷冻保存或直接用于进一步的REP,在标准方案中通常需要大约 14 d。在 REP 期间,TIL 通常在培养瓶中培养,然后转移到透气袋中以扩增培养物。在培养瓶中,TIL 会受到 IL-2、抗 CD3 抗体和辐照饲养细胞的刺激进一步扩展到治疗水平。辐照饲养细胞通常来源于同种异体或自体外周血单核细胞,可激活和释放生长因子,促进 TIL 扩增。在输注 TIL 前需要采用非清髓性淋巴细胞清除方案联合化疗或全身照射进行淋巴细胞的耗竭,这也是 TIL 治疗的一个重要里程碑。该方案最初在小鼠模型中使用,在淋巴细胞清除后反应性 TIL 的数量得到显著的提高。值得注意的是,大多数患者都经历了非清髓性淋巴细胞清除方案引起的不良反应,如中性粒细胞减少、淋巴细胞减少和凝血功能障碍,这些都是血液学的副作用[28]。但这些事件大多可以通过控制用药量和对症处理得到控制。

2.2 TIL 疗法在 BCa 中的临床试验与研究进展

2.2.1 BCa 中的肿瘤浸润淋巴细胞水平和治疗

过继细胞疗法是一种癌症免疫疗法,它利用患者自身的免疫细胞来寻找和消除肿瘤细胞。而基于肿瘤浸润淋巴细胞的过继细胞免疫疗法,可以使患者自己的(自体)免疫细胞能够用于 ACT 治疗[29]。虽然 TIL-ACT 在 BCa 中表现出巨大的潜力,但正处于一个初步探索阶段。目前,研究者们正僵持在肿瘤浸润淋巴细胞疗法的第一步,即从人 BCa 肿瘤组织中分离出反应性 TIL,以及分离后的 TIL 增强并扩增得到足够数量的有效 TIL。但也取得部分进展,如 Soave 等[30]已经证明,从膀胱肿瘤和 BCa 淋巴结转移处去扩增肿瘤反应性 TIL 是可行的。他们还综述了影响 TIL 扩增的因素,如发现与单纯 BCa 相比,混合性 BCa 与扩增 TIL 的抗肿瘤反应性更高相关;既往接受过 BCG 免疫治疗的原发肿瘤扩增 TIL 的抗肿瘤反应性较低,但在含有 IL-2 的培养基中加入激动性 4-1BB 抗体可改善先前接受 BCG 免疫疗法治疗的原发性肿瘤中扩增的 TIL 数量;基底型和管腔亚型肿瘤的反应性 TIL 生长方面并无显著差异;他们还观察到虽然基底亚型膀胱肿瘤似乎产生更多的反应性 TIL,但分子亚型与反应性 TIL 生长之间无任何显著关联。总之,他们证明了从 TURBT 获得的膀胱肿瘤样本中可以成功地扩增 TIL,这大大增加了将来对 BCa 患者实施 TIL 疗法临床试验的潜力。此外,一项使用吉西他滨作为淋巴细胞清除剂的研究表明,由于髓源性抑制细胞和其他免疫群体的积累,吉西他滨在肿瘤较小时具有杀瘤特性占主导地位,而当肿瘤较大时,淋巴细胞清除特性占主导地位[31]。最后,他们发现使用吉西他滨作为淋巴细胞清除剂可以增强 ACT 的抗肿瘤反应。但过度使用环磷酰胺和氟达拉滨进行全身性非清髓性的预处理可能会减弱过继转移的 T 细胞的活性并产生部分毒性。总之,目前的 TIL 主要还是与其他化疗或免疫检查点抑制剂联合使用,但也有部分动物实验和临床试验初步显示 TIL-ACT 可以减缓或者抑制肿瘤的生长。Inoue 等[32]发现颗粒酶 B 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞在犬膀胱移行细胞癌中起到抗肿瘤免疫作用并抑制肿瘤进展。他们将犬膀胱移行细胞癌和正常膀胱组织进行对比,分别对 2 组的 CD3 和颗粒酶 B 进行免疫组织化学分析。结果发现 $CD3^+$ 和颗粒酶 B 阳性的 TIL 水平和犬膀胱移行细胞癌的生存率成正比。Bazargan 等[33]发现在小鼠模型中全身或膀胱内递送 TIL 可以延缓肿瘤生长的能力。他们使用 OT-I T 细胞和表达卵清蛋白的 MB49 肿瘤细胞系的模型系统,分别进行全身性的 TIL-ACT 治疗和直接向小鼠膀胱内注入反应性 TIL。结果显示,与对照治疗的小鼠相比,全身性 ACT 治疗的小鼠肿瘤生长减少,而 T 细胞浸润增加并拥有长期的免疫保护。而在原位小鼠肿瘤中,膀胱内递送的 OT-I T 细胞能够在没有淋巴细胞耗竭化疗或 IL-2 的情况下控制肿瘤生长。这项研究也给我们一些关于 TIL 在不同阶段的 BCa 治疗的经验和启示。美国佛罗里达州坦帕市莫菲特癌症中心正在开展关于膀胱内输注 TIL 用于高级别 NMIBC 的临床试验,但结果还未公布。在我们国家,我们尚未发现 TIL 疗法在 BCa 方面的临床试验,仅发现“TIL 治疗实体肿瘤或肺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌等”的临床试验,这或许是我们研究的缺陷。这也为我们提供了 BCa 治疗相关临床试验的新方向。截至目前,我们已经发现通过 TURBT、RC 或远处转移活检获得的肿瘤组织可以用作 TIL 的来源;其次,TIL 疗法能够通过不同的途径进行。尤其是全身的 TIL-ACT 治疗或许可以为转移性 BCa 患者提供新型解决策略;为 NMIBC 患者提供了一种保留膀胱的治疗选择,为 MIBC 患者的新辅助或辅助治疗提供一种或多种新型联合治疗。综上所述,这些研究表明 TIL-ACT 或许具有治疗 BCa 患者的潜力,并可以大大改善患者的生活质量。

2.2.2 BCa 中的肿瘤浸润淋巴细胞水平和预后

TME 由缺氧或局部酸中毒等特定条件和不同的免疫细胞群组成,包括各种亚型的 TIL。许多研究表明肿瘤侵袭性与免疫系统有关,TIL 密度可能是疾病侵袭性的标志。如,$CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD8^+$ TIL 与肿瘤的多样性和预后或生存率有显著的相关性[33]。另一项研究显示,T1b 亚期的 TIL 浸润率显著高于 T1a 亚期[34]。但 Balar 等[34]发现 Ta 期和 T1 期肿瘤基质中 $CD3^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞的表达水平不同,T1 期肿瘤浸润更深,而高级别

NMIBC 的肿瘤内 $CD8^+$ T 细胞计数明显低于 MIBC。Krpina 等[35]认为 TIL 可以预测孤立性低级别 NMIBC 患者的 BCa 复发。他们的研究结果显示，非复发组患者 $CD3^+$ 和 $CD8^+$ 淋巴细胞数量低于复发组。Mariuzza 等[36]也认为 NMIBC 中的 $CD3^+$ T 细胞可以预测肿瘤的进展和相关的短期无复发生存期。他们认为虽然 TIL 数量与 BCa 复发之间可能存在联系，但更重要的是 TIL 亚群比例。与对照组比较，复发组的 $CD4^+/CD8^+$ TIL 比值显著降低，或者更具体地说，该组的 $CD8^+$ TIL 数量较多，因此他们认为相较于 $CD4^+$，$CD8^+$ TIL 可能与 BCa 复发有关[34]。Salama 等[37]也认为 $CD8^+$ TIL 确实可以预测肌层浸润性尿路上皮癌的生存率。综上所述，高级别的 NMIBC 结果与低级别 NMIBC 结果并不一致。在低级别 NMIBC 患者中的 $CD8^+$ TIL 和 $CD3^+$ TIL 的数量或比例与患者病情严重程度或复发率成正比。而在高级别 NMIBC 中 TIL 密度与患者病情严重程度或复发率、进展程度和总生存期无差异。总之，我们认为 CD3 或 CD8 的浸润密度较高可能反映了免疫系统对恶性细胞的活性状态较高。

BCa 患者的预后取决于肿瘤与周围微环境之间的相互作用。先前的研究已经表明 TIL 及其亚群结构与 BCa 患者的预后有关。我们发现具有预后意义的 TIL 生物标志物有益于选择对免疫治疗有反应的患者，并改善 MIBC 的临床管理。Salama 等[37]对 TIL 在 MIBC 中的作用研究表明 $CD8^+$ TIL 的较高浸润率与更好的生存率有关。Seiler 等[38]也发现 CD3 T 细胞浸润与 MIBC 患者良好预后有关。Horn 等[39]报道了 FOXP3 和 $CD3^+$ TIL 或 $CD8^+$ TIL 之间的比率与 BCa 生存率显著相关。Shi 等[40]发现高 CD3/CD4 比率预示着 MIBC 患者的生存率更高，并且其与基底鳞状肿瘤的生存率的相关性可能更强。综上所述，肿瘤组织内高比例的 CD3 和 CD8 阳性淋巴细胞浸润或许意味着 MIBC 患者的预后更好。需要注意的是，上述研究可能未区分肿瘤中心和周围采集的肿瘤淋巴细胞，这可能解释了研究之间不一致的结果。而越来越多的证据表明，需要解决淋巴细胞在肿瘤核心和浸润边缘之间的分布问题，因为它们对临床结果的影响可能不同。因此，为了更方便地评估 TIL 与 BCa 患者的预后相关性，Nassif 等[41]得出了一个简单的分类系统，称为“免疫评分（由低至高是Ⅰ0～Ⅰ4）”。该评分是根据肿瘤中心和周围中 CD3 和 CD8 TIL 的密度来计算的。根据先前的研究，最低分数与最差的预后有关。Yu 等[42]认为 CD3 及 CD8 TIL 和免疫评分可以作为 MIBC 患者的（在 RC 后）预后标志物。一项研究表明改良免疫评分（mIS）在接受 RC 的 BCa 患者中具有预后价值，可以作为指导接受 RC 后 BCa 患者的风险适应治疗或随访策略的预后标志物。此外，也有研究者提出一个新想法，他们发现分别从 TURBT 和 RC 时从患者身上采集血液、肿瘤和区域淋巴结的 TIL，结果发现与淋巴结和血液中的 $CD4^+$ TIL 相比，肿瘤浸润性 $CD4^+$ TIL 在所有 4 个研究谱系位点中均显著低甲基化[43]。这或许是一种新的检测方式，需要我们进一步探讨其是否可以作为新型评估方法。总之，研究者还需要进一步努力完善一系列的评估方法。

目前，虽然在转移性 BCa 患者中铂类联合化疗仍然是标准的一线治疗，但 TIL 的潜在预测价值也引起了科学界的极大兴趣。PD-L1 是一种免疫反应的检查点分子，并与局限性 BCa 患者的不良结局有关。已经发现免疫检查点分子 PD-L1 的上调与 T 细胞的活化有关，并依赖于它们在 TME 中的存在[43-44]。目前，PD-L1 抑制剂在治疗转移性 BCa 方面取得了有希望的初步结果[45]。另一方面，PD-L1 在肿瘤浸润淋巴细胞上的表达与更好的结局有关[46]。与之前在 MIBC 和其他肿瘤类型中的数据一致，我们观察到 TIL 密度与 PD-L1 表达之间存在很强的相关性[17,29]。总之，TIL 在 MIBC 术前和术后的样本中提供了重要的预后信息，并独立于 NAC[47]。随着更多针对不同或多个检查点或刺激途径的新型药物的开发，PD-L1 和 TIL 联合评估可能在预测对免疫检查点抑制的反应方面具有价值。

2.3　TIL 疗法的局限性和未来展望

肿瘤浸润淋巴细胞免疫疗法是一种具有潜力的个体化免疫治疗策略，但在临床应用中仍然存在一些挑战与问题。TIL 的体外扩增是 TIL 疗法的关键环节，但如何准确和成功地扩增到治疗水平的反应性 TIL 是困难的。由于 TIL 在体内数量有限且受到 TME 的影响，导致 TIL 的体外扩增过程往往困难，扩增效率低下。而为了实现持久的抗肿瘤效应，必须挑选出具有抗肿瘤活性的效应 T 细胞。因为患者的免疫系统可能存在免疫耐受性，使得 TIL 治疗难以有效地激活。虽然目前使用 IL-2、抗 PD-1、抗 41BB 或抗 CTLA-4 可以提高扩增的效率，但是并没有大样本量的临床试验和研究表明这些处理能够扩增反应性 TIL 达到临床上的需求。此外，当 TIL 转移到特定的培养基中，开始扩增过程时，由于这一过程可能需要数周时间，研究者很难注意到各种各样的调整培养条件，如温度、气体组成和培养基营养物质。这需要研究者们开发更多、更简洁和更高效的培养方法。总之，TME 仍然是 TIL 治疗的主要障碍。因此，反应性 TIL 的分离、筛选和扩增仍有相当大的改进空间。

另外一个重要的问题是全身 TIL 治疗时如何保证反应性的 TIL 能够准确地与肿瘤组织接触。

我们都知道，TIL 运输到肿瘤中时首先需要识别内皮细胞（主要位于肿瘤基质中）表面分泌并结合的趋化因子。这种初始的内皮识别之后是由选择素介导的滚动黏附，然后是整合素的牢固黏附。但这个过程效率极低，往往会导致很少有 TIL 成功地与肿瘤细胞相互作用。总之，临床前和临床研究的结果都表明，全身治疗后 TIL 向肿瘤的运输效率非常低，并且大部分这种运输很可能在注射后不久发生（尽管没有得到很好的研究）。

现阶段我们主要关注 TIL 在 BCa 中的治疗和预后。这些研究主要基于不同 TIL 亚群的免疫组织化学定量，但结果有些相互矛盾。我们认为其主要原因是在它们都是在相对较小的队列中进行回顾性研究，所以导致 TIL 的定义、纳入以及采用的评分方法各不相同。这些不一致阻碍了研究之间的比较以及将研究结果外推到临床环境。因此，标准化评估方法将有助于提高可比证据的数量和质量，并使 TIL 评分能够在大规模临床试验和常规组织病理学实践中实施。希望这种标准化方法将帮助临床医生、研究人员和病理学家评估 TIL 评估的效用，以期预后和预测对治疗的反应。

另外，由于每个患者的肿瘤特征和免疫状态各不相同，TIL 疗法需要制定个体化的治疗方案，这其中就包括 TIL 的选择、体外扩增条件、治疗剂量等，而这些步骤无一不是具有高难度和复杂的，目前研究人员还在探索中。尽管初步的临床研究结果显示 TIL 疗法在某些患者中表现出一定的疗效，但目前并没有大量的和大样本量的临床试验表明其长期疗效，尤其是其单独使用的疗效。因此其长期的治疗效果和生存率尚需进一步观察和研究。TIL 疗法的体外扩增和个体化治疗方案制定为治疗带来了较高的成本，而且需要专业的技术支持和设施，这可能限制了其在临床上的广泛应用，尤其是在一些贫困地区，因此想要大规模地推广或许是一件不容易的事情。综上所述，虽然 TIL-ACT 在肿瘤治疗领域展现出了良好的前景，但在临床应用中仍面临诸多挑战与问题。需要进一步的研究和技术改进，以克服这些挑战，提高 TIL-ACT 的疗效和安全性，为患者带来更好的治疗效果。我们也将继续研究全身和膀胱内 TIL 递送的最佳治疗方法，包括与抗 PD-1 或抗 PD-L1 免疫疗法的联合治疗。我们希望通过研究人员、临床医生和病理学家的努力，TIL 的重要性越来越得到认可。

3 结论

在此，首先我们确定了 TIL 可以从原发性膀胱肿瘤、淋巴结和转移性 BCa 患者中采集并分离出来，能够成功地在体外扩增并证明其具有抗肿瘤活性。其次 TIL 在治疗方面并无很大的进展，仅停留在动物实验和初步的临床试验阶段，但与免疫检查点抑制剂的联合使用研究得到大多研究者的支持。最后，目前许多研究人员都在关注不同亚群的 TIL 和不同 TIL 密度在不同进展程度的 BCa 疗效预测和预后的判断。由于评估方法的不同，往往会产生分歧，因此，目前临床上急需一个标准的 TIL 免疫评估方法，以帮助医师对 BCa 患者做出更好的临床决策。总之，TIL 在 BCa 中的应用目前仍处于初步探索阶段，其潜力之大仍需广大研究者的进一步的深度挖掘。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Semeniuk-Wojtaś A, Poddębniak-Strama K, Modzelewska M, et al. Tumour microenvironment as a predictive factor for immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2023, 72(7): 1971-1989.

[2] Compérat E, Larré S, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old[J]. Virchows Arch, 2015, 466(5): 589-594.

[3] Lenis AT, Lec PM, Chamie K, et al. Bladder Cancer: A Review[J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980-1991.

[4] Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer(TaT1 and Carcinoma In Situ)-2019 Update[J]. Eur Urol, 2019, 76(5), 639-657.

[5] Shepherd AR, Shepherd E, Brook NR. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin with interferon-alpha versus intravesical Bacillus Calmette-Guérin for treating non-muscle-invasive bladder cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 3(3): CD012112.

[6] Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse[J]. Nature, 1959, 184(Suppl 5): 291-292.

[7] Zouein J, Boueri M, Kourie HR, et al. Advanced bladder cancer management: history in the making[J]. Future Oncol, 19(39), 2565-2567.

[8] 曾世平，黄应龙，李宁. 新辅助化疗在肌层浸润性膀胱癌中的应用现状及研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志，2020，35(5)：413-416，420.

[9] 白红松，胡林军，谢成明，等. 化疗联合 PD-1 抑制剂治疗转移性膀胱癌的安全性及近期疗效观察[J]. 临床泌尿外科杂志，2022，37(5)：338-341.

[10] De Maeseneer DJ, Delafontaine B, Rottey S. Checkpoint inhibition: new treatment options in urologic cancer[J]. Acta Clin Belg, 2017, 72(1): 24-28.

[11] Sylvester RJ, van der MEIJDEN APM, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials[J]. J Urol, 2002, 168(5): 1964-1970.

[12] LaRue H, Ayari C, Bergeron A, et al. Toll-like receptors in urothelial cells: targets for cancer immunother-

apy[J]. Nat Rev Urol，2013，10(9)：537-545.

[13] Rhea LP，Mendez-Marti S，Kim D，et al. Role of immunotherapy in bladder cancer[J]. Cancer Treat Res Commun，2021，26：100296.

[14] Gakis G，Efstathiou J，Lerner SP，et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012：Radical cystectomy and bladder preservation for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder[J]. Eur Urol，2013，63(1)：45-57.

[15] Chang SS，Bochner BH，Chou R，et al. Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer：AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline[J]. J Urol，2017，198(3)：552-559.

[16] Meeks JJ，Bellmunt J，Bochner BH，et al. A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. Eur Urol，2012，62(3)：523-533.

[17] See WA. Commentary on "Carboplatin based induction chemotherapy for nonorgan confined bladder cancer：a reasonable alternative for cisplatin unfit patients?" Mertens LS，Meijer RP，Kerst JM，Bergman AM，van Tinteren H，van Rhijn BW，Horenblas S，Department of Urology，The Netherlands Cancer Institute，Antoni van Leeuwenhoek Hospital，Amsterdam，The Netherlands：J Urol，2012，188(4)：1108-1113 [Epub 2012 Aug 15][J]. Urol Oncol，2013，31(5)：716-717.

[18] Balli S，Bolek H，Ürün Y. Emerging Strategies in Adjuvant Immunotherapy：A Comparative Review of Bladder Cancer and Renal Cell Carcinoma Treatments[J]. Clin Med Insights Oncol，2024，18：11795549241257238.

[19] Powles T，Kockx M，Rodriguez-Vida A，et al. Clinical efficacy and biomarker analysis of neoadjuvant atezolizumab in operable urothelial carcinoma in the ABACUS trial[J]. Nat Med，2019，25(11)：1706-1714.

[20] Gust KM，Shariat SF. Re：pembrolizumab as neoadjuvant therapy before radical cystectomy in patients with muscle-invasive urothelial bladder carcinoma (PURE-01)：an open-label，single-arm，phase Ⅱ study[J]. Eur Urol，2019，75(4)：695-696.

[21] Mounir M，Lucchetta M，Silva TC，et al. New functionalities in the TCGAbiolinks package for the study and integration of cancer data from GDC and GTEx[J]. PLoS Comput Biol，2019，15(3)：e1006701.

[22] Huang SC，Song ZJ，Zhang TS，et al. Identification of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of glioblastomas[J]. Front Immunol，2020，11：585034.

[23] Zhang DC，He WT，Wu C，et al. Scoring system for tumor-infiltrating lymphocytes and its prognostic value for gastric cancer[J]. Front Immunol，2019，10：71.

[24] Rosenberg SA，Spiess P，Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Science，1986，233(4770)：1318-1321.

[25] Nguyen LT，Yen PH，Nie J，et al. Expansion and characterization of human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes(TILs)[J]. PLoS One，2010，5(11)：e13940.

[26] Aydin AM，Bunch BL，Beatty M，et al. The Factors Affecting Expansion of Reactive Tumor Infiltrating Lymphocytes(TIL) From Bladder Cancer and Potential Therapeutic Applications[J]. Front Immunol，2021，12：628063.

[27] Ahmadzadeh M，Johnson LA，Heemskerk B，et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired[J]. Blood，2009，114(8)：1537-1544.

[28] Tran E，Turcotte S，Gros A，et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific $CD4^+$ T cells in a patient with epithelial cancer[J]. Science，2014，344(6184)：641-645.

[29] Solinas C，Chanzá NM，Awada A，et al. The immune infiltrate in prostate，bladder and testicular tumors：an old friend for new challenges[J]. Cancer Treat Rev，2017，53：138-145.

[30] Soave A，Kluwe L，Yu H，et al. Copy number variations in primary tumor，serum and lymph node metastasis of bladder cancer patients treated with radical cystectomy[J]. Sci Rep，2020，10(1)：21562.

[31] Le HK，Graham L，Cha E，et al. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice[J]. Int Immunopharmacol，2009，9(7-8)：900-909.

[32] Inoue A，Maeda S，Kinoshita R，et al. Density of tumor-infiltrating granzyme B-positive cells predicts favorable prognosis in dogs with transitional cell carcinoma[J]. Vet Immunol Immunopathol，2017，190：53-56.

[33] Bazargan S，Bunch B，Ojwang AME，et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells with gemcitabine to enhance efficacy of adoptive cell therapy in bladder cancer[J]. Front Immunol，2023，14：1275375.

[34] Balar AV，Kamat AM，Kulkarni GS，et al. Pembrolizumab monotherapy for the treatment of high-risk non-muscle-invasive bladder cancer unresponsive to BCG(KEYNOTE-057)：an open-label，single-arm，multicentre，phase 2 study[J]. Lancet Oncol，2021，22(7)：919-930.

[35] Krpina K，Babarović E，Jonjić N. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes with bladder cancer recurrence in patients with solitary low-grade urothelial carcinoma[J]. Virchows Arch，2015，467(4)：443-448.

[36] Mariuzza RA，Agnihotri P，Orban J. The structural basis of T-cell receptor(TCR) activation：An enduring enigma[J]. J Biol Chem，2020，295(4)：914-925.

[37] Salama P，Phillips M，Grieu F，et al. Tumor-infiltra-

ting FOXP3^{+} T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2009,27(2):186-192.

[38] Seiler R,Ashab HAD,Erho N,et al. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy[J]. Eur Urol,2017,72(4):544-554.

[39] Horn T,Laus J,Seitz AK,et al. The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer[J]. World J Urol,2016,34(2):181-187.

[40] Shi MJ,Meng XY,Wu QJ,et al. High CD3D/CD4 ratio predicts better survival in muscle-invasive bladder cancer[J]. Cancer Manag Res,2019,11:2987-2995.

[41] Nassif EF,Thibault C,Oudard S,et al. Precision immunity:Immunoscore and neoadjuvant treatment in bladder cancer[J]. Oncoimmunology, 2021, 10(1): 1888488.

[42] Yu A,Mansure JJ,Solanki S,et al. Presence of lymphocytic infiltrate cytotoxic T lymphocyte CD3^{+}, CD8^{+},and immunoscore as prognostic marker in patients after radical cystectomy[J]. PLoS One,2018,13(10):e0205746.

[43] Bieri U,Enderlin D,Buser L,et al. Modified immunoscore improves the prediction of progression-free survival in patients with non-muscle-invasive bladder cancer:A digital pathology study[J]. Front Oncol, 2022,12:964672.

[44] Takayama H,Nishimura K,Tsujimura A,et al. Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma *in situ* after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation[J]. J Urol,2009,181(4):1894-1900.

[45] Xylinas E,Robinson BD,Kluth LA,et al. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder[J]. Eur J Surg Oncol,2014, 40(1):121-127.

[46] Bellmunt J,Mullane SA,Werner L,et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma[J]. Ann Oncol,2015,26(4):812-817.

[47] Wahlin S,Nodin B,Leandersson K,et al. Clinical impact of T cells,B cells and the PD-1/PD-L1 pathway in muscle invasive bladder cancer:a comparative study of transurethral resection and cystectomy specimens [J]. Oncoimmunology,2019,8(11):e1644108.

(收稿日期:2024-07-11)

(上接第 788 页)

[28] Xu XP,Liu Y,Zhang X,et al. Preoperative prediction of muscular invasiveness of bladder cancer with radiomic features on conventional MRI and its high-order derivative maps[J]. Abdom Radiol,2017,42(7): 1896-1905.

[29] Tong YB,Udupa JK,Wang C,et al. Radiomics-guided therapy for bladder cancer:Using an optimal biomarker approach to determine extent of bladder cancer invasion from t2-weighted magnetic resonance images [J]. Adv Radiat Oncol,2018,3(3):331-338.

[30] Xu XP,Zhang X,Tian Q,et al. Quantitative identification of nonmuscle-invasive and muscle-invasive bladder carcinomas:a multiparametric MRI radiomics analysis[J]. J Magn Reson Imaging,2019,49(5):1489-1498.

[31] Zheng JJ,Kong JQ,Wu SX,et al. Development of a noninvasive tool to preoperatively evaluate the muscular invasiveness of bladder cancer using a radiomics approach[J]. Cancer,2019,125(24):4388-4398.

[32] Xu SS,Yao QY,Liu GQ,et al. Combining DWI radiomics features with transurethral resection promotes the differentiation between muscle-invasive bladder cancer and non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Eur Radiol,2020,30(3):1804-1812.

[33] Hammouda K,Khalifa F,Soliman A,et al. A multiparametric MRI-based CAD system for accurate diagnosis of bladder cancer staging[J]. Comput Med Imaging Graph,2021,90:101911.

[34] Teleka S,Häggström C,Nagel G,et al. Risk of bladder cancer by disease severity in relation to metabolic factors and smoking:a prospective pooled cohort study of 800,000 men and women[J]. Int J Cancer,2018, 143(12):3071-3082.

[35] Huang XX,Pan T,Yan LL,et al. The inflammatory microenvironment and the urinary microbiome in the initiation and progression of bladder cancer[J]. Genes Dis,2021,8(6):781-797.

[36] Zhou Q,Zhang ZY,Ang XJ,et al. A nomogram combined with radiomics features,albuminuria,and metabolic syndrome to predict the risk of myometrial invasion of bladder cancer[J]. Transl Cancer Res,2021,10(7):3177-3191.

(收稿日期:2024-07-01)