

·综述·

骨肉瘤免疫治疗的研究进展

王玲^{1,2} 王燕³ 冯琛¹ 潘禹铮¹ 张英泽¹

【摘要】 骨肉瘤是骨恶性肿瘤中最常见的一种,常常危害儿童和青少年,易发生早期转移,病情进展快、预后差。新辅助化疗结合手术治疗使骨肉瘤患者的5年生存期提高到50%~60%,但仍有部分患者会复发及转移。近年来随着免疫学技术的发展,以及对骨肉瘤的发病机制认识的深入,免疫治疗在骨肉瘤综合治疗中发挥着越来越重要的作用。

【关键词】 骨肉瘤; 适应性免疫; 免疫疗法,主动

Advancement of the research on the immunotherapy for osteosarcoma Wang Ling^{1,2}, Wang Yan³, Feng Chen¹, Pan Yuzheng¹, Zhang Yingze¹. ¹Orthopedic Research Institution of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China; ²Department of Orthopedic Oncology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; ³Department of Allergy, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding author: Zhang Yingze, Email: yzling_liu@163.com

【Abstract】 Osteosarcoma is one of the most common malignant bone tumors that often jeopardize children and adolescents. The prognosis of osteosarcoma is poor because of its early metastasis. Neoadjuvant chemotherapy combined with surgery can improve the 5-year survival of patients with osteosarcoma up to 50%-60%, but some patients are still likely to relapse and metastasis. With the rapid development of immunology technology in recent years, and more in-depth pathogenesis of osteosarcoma are conducted, immunotherapy may play more and more important role in the comprehensive treatment of osteosarcoma.

【Key words】 Osteosarcoma; Adaptive immunity; Immunotherapy, active

骨肉瘤是由间胚叶细胞发展而来的一种恶性程度极高的、严重威胁患者健康和生命的原发性骨肿瘤^[1-2]。该肿瘤可发生于任何年龄,尤其好发于10~30岁的青少年^[3-4]。骨肉瘤多见于血运丰富的干骺端,易发生早期转移,病情进展快、预后差。目前,骨肉瘤的主要治疗方法仍是手术联合辅助化疗,但生存率并没有提高到满意的程度,因此亟待寻找新的治疗方法来进一步改善骨肉瘤患者的预后。随着医学技术的发展,肿瘤的免疫治疗逐渐成为继手术、放化疗之后的第四种治疗模式^[5-6]。与传统一般治疗方法相比,免疫治疗不仅可以直接激活机体的免疫细胞杀伤肿瘤,而且还可以重建肿瘤患者的免疫微环境、调动机体自身的免疫功能来发挥抑制肿瘤的作用,在一定程度上让肿瘤与机体处于一种相对的平衡状态,延长患者的生存期、提高患者的生存质量。

近年来随着免疫学理论不断丰富,现代免疫学技术也在不断推陈出新,大量的骨肉瘤抗原不断被发现,如硫酸软骨

素蛋白聚糖4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4)^[7]、黑色素瘤特异性抗原(preferentially expressed antigen of melanoma, PRAME)^[8]以及共刺激分子细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)^[9]、B7-H3^[10]、B7-H4^[11]等,使得骨肉瘤的免疫治疗成为一种极富前景的治疗方法,现综述如下。

一、骨肉瘤被动免疫治疗

被动免疫治疗,即过继性免疫治疗,最早是由Mitchison^[12]于1955年提出。被动免疫治疗是通过将自体或异体免疫细胞在体外给予不同细胞因子的刺激进行扩增,继而回输入患者体内,发挥调动机体免疫功能、发挥杀灭肿瘤的作用^[13]。被动免疫治疗可分为两类,第一类为非特异性免疫细胞,包括自体淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine-activated killer, LAK)、细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)及自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)等;另一类为特异性免疫细胞,包括肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)、细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)以及经基因修饰改造的T细胞。

(一)骨肉瘤与CIK细胞治疗

CIK是人外周血单个核细胞在体外经干扰素- γ 、白细胞介素-2和CD3单克隆抗体等多种细胞因子刺激后获得的一群异质细胞,具有较强的杀瘤活性^[14]。Wongkajornsilp等^[15]

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2017.06.013

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772858);国家自然科学基金青年基金(81402228);河北省自然科学基金青年基金(H2015206216)

作者单位:050051 石家庄,河北省骨科研究所¹;050051 石家庄,河北医科大学第三医院骨与软组织肿瘤科²;050011 石家庄,河北医科大学第一医院变态反应科³

通信作者:张英泽, Email: yzling_liu@163.com

研究发现,给予骨肉瘤患者自体肿瘤RNA负载树突状细胞(dendritic cells, DC)进行CIK治疗,其溶瘤效果是未负载的6倍以上,并且在CIK细胞数量较低时,肿瘤RNA负载DC仍可存在并具有维持刺激活化CIK的能力。随后,Todorovic等^[16]又对骨肉瘤CIK治疗方法进行了改良,他们在体外扩增CIK时加入了照射过的同种异体外周血单核细胞,他们发现这样扩增的CIK细胞数目远远超过传统单纯CIK治疗。通过这种方法扩增CIK细胞中CD3CD56亚群是未扩增的2 243倍,远高于传统方法362倍的扩增效果。但总体而言,CIK细胞是一群异质性细胞,具有靶向性差的缺点,将来也会被其它更好的细胞治疗技术替代。

(二)骨肉瘤与TIL细胞治疗

TIL是肿瘤区聚集的免疫细胞,被认为是机体为了诱导免疫反应的一种防御机制,与非浸润型淋巴细胞相比,他们具有更强大的免疫活性和杀伤肿瘤作用。TIL细胞疗法是Rosenberg研究小组深入研究肿瘤微环境后所开创的另一种过继细胞免疫疗法^[17]。Théoleyre等^[18]研究发现骨肉瘤中TIL细胞2/3是CD4⁺T细胞,1/3是CD8⁺T细胞。来自骨肉瘤的TIL对同种异体的肿瘤细胞展现出显著的细胞毒活性,表明TIL可成为治疗成人骨肉瘤有效方法。此外,Fritzsche等^[19]研究发现骨肉瘤浸润的TIL中CD8⁺/FOXP3⁺比例高的患者生存期显著高于低比例的患者,对于将来的免疫治疗有很好的指示作用。

(三)骨肉瘤与CTL细胞治疗

CTL是一种特异性效应T细胞,可分泌多种细胞因子参与免疫作用,对某些细菌、病毒、肿瘤细胞等抗原物质具有杀伤作用,成为机体重要的防御细胞,被认为是过继免疫治疗的枢轴细胞^[20]。CTL具有人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)限制性,可存在与肿瘤细胞特异结合的抗原表位,靶向杀伤突变的肿瘤细胞。但CTL的抗肿瘤作用能被其本身表达的抑制性受体CTLA-4及程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)所抑制。Wang等^[21]研究发现,CTLA4基因+49G/A多态性与骨肉瘤的风险密切相关。此外,Liu等^[22]也发现CTLA4基因+49>A多态性,而不是-318C>T多态性,可增加包括骨肉瘤在内的骨肿瘤的发病风险。Contardi等^[23]研究发现,高表达CTLA-4的骨肉瘤细胞系在给予CTLA-4配体CD80和CD86后,可显著上调caspase-8、caspase-3表达从而诱导细胞凋亡。最近,Lussier等^[24]发现PD-1在骨肉瘤患者外周血的CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞表面表达显著增加,发生转移的患者PD-1⁺CD4⁺细胞比例显著增加,提示PD-1在骨肉瘤疾病进展中的重要作用。阻断PD-1/PD-L1信号通路可增加骨肉瘤反应性CTL的活性及功能,降低肿瘤负荷。在Lussier等^[25]最新的研究进展中发现,在K7M2小鼠骨肉瘤模型中同时阻断CTLA-4和PD-1效果更加显著,大部分荷瘤鼠的肿瘤得到了完全控制。总之,阻断CTL抑制性受体增加了临床治愈骨肉瘤等恶性肿瘤的可行性,但其复杂机制还需进一步探究。

(四)骨肉瘤与NK细胞治疗

NK细胞被认为是机体抗感染、抗肿瘤的第一道天然防

线,主要标志为CD3⁺CD16⁺CD56⁺。NK细胞无需肿瘤特异性抗原识别便可以直接杀伤肿瘤细胞,是肿瘤免疫治疗的重要效应细胞。近年来针对NK细胞的免疫治疗研究逐渐受到人们的关注^[26]。Kubista等^[27]发现高热能导致NK细胞对骨肉瘤细胞的杀伤作用敏感,其机制与热休克蛋白72(heat shock proteins-72, hsp-72)表达增加有关。Guma等^[28]发现IL-2联合NK细胞疗法可有效增强NK细胞活性及功能,抑制骨肉瘤患者的肺转移。Chang等^[29]将NKG2D-DAP10-CD3 ζ 转入NK细胞,发现NK细胞的杀伤及毒性功能显著增强,并对非恶性细胞无毒副作用。通过该方法,可有效促进NK细胞因子的分泌,包括IFN- γ 、GM-CSF、IL-13、MIP-1 α 、MIP-1 β 、CCL5和TNF- α 等,可有效抑制包括骨肉瘤在内的多种肿瘤细胞及降低荷瘤小鼠的肿瘤负担。Buddingh等^[30]发现IL-15可通过DNAM-1和NKG2D通路显著增强NK细胞的杀伤活性,尤其对于化疗耐药的患者,在自体或同种异体的体外扩增的NK细胞中加入IL-15,可有效提高NK的抑瘤作用,通过此法有望延长患者的生存期。以上研究均不同程度的提高了NK细胞的杀伤肿瘤作用,为骨肉瘤的免疫治疗提供了新的策略。

二、骨肉瘤主动免疫治疗

骨肉瘤的主动免疫治疗方法主要包括非特异性主动免疫治疗(如:细胞因子治疗)、特异性主动免疫治疗(肿瘤疫苗)以及基因治疗。

(一)骨肉瘤与细胞因子治疗

细胞因子是在免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导机体的免疫细胞和非免疫细胞合成、分泌的小分子多肽类因子,参与调节多种细胞生理及免疫应答的功能。目前常见的细胞因子包括:白细胞介素、干扰素、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、肿瘤坏死因子(tumornecrosis factor, TNF)、趋化因子家族等,它们在细胞之间传递信息,对免疫系统中起着非常重要的调控作用,研究细胞因子有助于阐明分子水平的免疫调节机制,并进一步对疾病的预防、诊断和治疗提供重要信息。目前临床上,通过补充或添加细胞因子水平与化疗药物配合使用,充分发挥细胞因子的生物学作用,促进免疫细胞的增殖和分化,增强抗感染和杀肿瘤细胞效应,发挥免疫调节作用,达到治疗疾病的目的。

20世纪70年代应用干扰素治疗肿瘤的临床实验已开展,目前已有大量的实验证明IFN对骨肉瘤的生长及转移有抑制作用。Kubo等^[31]对40例骨肉瘤活检标本进行研究时发现,18例IFN- α/β 受体阳性表达的患者预后良好,提示IFN- α/β 受体可成为评估骨肉瘤患者预后的一个重要参考指标。Zhao等^[32]研究发现,IFN- α 可以增加顺铂等化疗药物的敏感性,抑制骨肉瘤细胞的侵袭转移能力,促进其凋亡和自噬。此外,Li等^[33]研究发现,IFN- γ 可以上调骨肉瘤细胞系HOS和U2OS表面Fas的表达,增加 $\gamma\delta$ T细胞的杀伤能力。Pahl等^[34]研究也发现,脂质体胞壁三肽刺激的M1型巨噬细胞只有在IFN- γ 协同作用下才可对骨肉瘤患者发挥良好的治疗效果。以上资料均提示IFN使骨肉瘤的临床治疗效果得到了很大的改善和提高,在骨肉瘤治疗中具有较高价值,将给骨肉瘤治疗带来新的希望。

(二)骨肉瘤与肿瘤疫苗

随着分子免疫学的进展,一系列肿瘤相关抗原及其特性得以确定。研究表明在一定条件下,肿瘤抗原可以激起强烈的免疫反应^[35-36]。大量关于肿瘤疫苗的临床研究正在进行,Marcove等^[37]和 Southam等^[38]早在上世纪70年代就用灭活的自体瘤苗对骨肉瘤病人进行特异性免疫治疗,发现肿瘤转移比对照组晚。Krishnadas等^[39]报道,利用DC负载瘤苗靶向抗原MAGE-A1,MAGE-A3和NY-ESO-1的临床I期实验正在复发和难治性骨肉瘤患者中开展,这种化疗和免疫治疗联合应用的方法更有针对性,对提高患者的预后有很大帮助。Domingo-Musibay等^[40]利用基因工程改造的麻疹疫苗可以有效地抑制骨肉瘤细胞增殖以及降低体内肿瘤的负荷。国内一些学者也尝试用融合骨肉瘤细胞的B细胞瘤苗或巨噬细胞瘤苗免疫裸鼠,在一定程度上可延缓肿瘤的生长^[41-42]。

(三)骨肉瘤与基因治疗

骨肉瘤的基因治疗是依据骨肉瘤发病机制中重要相关分子,通过载体将外源正常基因导入人体靶细胞,以纠正基因缺陷或发挥治疗作用。主要包括自杀基因疗法、肿瘤抑制基因疗法和细胞因子为基础的基因疗法等。骨肉瘤好发于血运丰富的干骺端,因此,肿瘤新生血管在肿瘤的生长、转移过程中起关键性作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前公认的最重要的血管生成因子,能特异性促进血管内皮细胞分裂、增殖及血管生长,调节体内血管的通透性,促进侧枝循环的建立,与骨肉瘤恶性程度高度相关。Tanaka等^[43]研究发现,口服VEGF的小分子抑制剂pazopanib可有效地降低肿瘤的大小及发生肺转移的概率。色素上皮衍生因子(Pigment Epithelium Derived Factor, PEDF)具有促细胞分化、抑制肿瘤生长及抗新生血管生成等抗肿瘤的作用。在骨肉瘤中,PEDF可通过抑制VEGF表达和诱导血管内皮细胞凋亡发挥很强的抑制血管生成作用,Broadhead等^[44]研究发现,PEDF在体外可有效抑制骨肉瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞。在体内,给予PEDF可以减小肿瘤体积及抑制肺转移。

此外,将自杀基因导入肿瘤细胞,通过此基因编码的特异性酶类,催化对细胞无毒的药物前体转变成细胞毒物质,从而导致携带该基因的细胞核酸合成受抑,达到杀死肿瘤细胞的目的。Seto等^[45]和 Pellinen等^[46]相继发现导入HSV-TK融合基因后骨肉瘤细胞株LM8对丙氧鸟苷的抑制作用更加敏感,并可明显抑制荷瘤小鼠体内肿瘤生长。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、尿激酶激活剂及(urokinase plasminogen activator, uPA)及环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、趋化因子受体(chemokine receptor, CXCR)等均是近些年骨肉瘤基因治疗的研究热点。Zhang等^[47]发现CXCR7在骨肉瘤组织中高表达,敲除该基因可抑制PI3K/AKT/ β -arrestin通路,以及MMP-9的表达,进而降低骨肉瘤细胞的增殖和侵袭。Zhao等^[48]发现在骨肉瘤细胞中降低COX-2表达,可显著抑制肿瘤细胞的增殖,并可降低VEGF、EGF及bFGF等表达进而抑制肿瘤细胞体外

的侵袭和转移。

随着肿瘤免疫学、肿瘤分子生物学及精准医学技术的不断发展和进步,人们对肿瘤的免疫逃逸机制认识和理解不断加深,通过体外优化免疫细胞培养、增强免疫细胞功能、改善免疫抑制微环境、开发更有靶向性的瘤苗等治疗方法,必将会为骨肉瘤患者带来更大的福音。

参 考 文 献

- 1 Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(16): 2431-2445.
- 2 Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma [J]. Cancer Treat Res, 2014, 162: 65-92.
- 3 Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27):3029-3035.
- 4 Dai X, Ma W, He X, et al. Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(8): RA177-RA190.
- 5 Hong CW, Zeng Q. Awaiting a new era of cancer immunotherapy [J]. Cancer Res, 2012, 72(15): 3715-3719.
- 6 Ghafouri-Fard S, Ghafouri-Fard S. siRNA and cancer immunotherapy [J]. Immunotherapy, 2012, 4(9): 907-917.
- 7 Beard RE, Zheng Z, Lagisetty KH, et al. Multiple chimeric antigen receptors successfully target chondroitin sulfate proteoglycan 4 in several different cancer histologies and cancer stem cells [J]. Immunother Cancer, 2014, 2(25).
- 8 Toledo SR, Zago MA, Oliveira ID, et al. Insights on PRAME and osteosarcoma by means of gene expression profiling [J]. J Orthop Sci, 2011, 16(4): 458-466.
- 9 Liu Y, He Z, Feng D, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms and susceptibility to osteosarcoma [J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(12):1051-1055.
- 10 Dong Q, Ma X. B7- H4 expression is associated with tumor progression and prognosis in patients with osteosarcoma [J]. Biomed Res Int, 2015: 156432.
- 11 Wang L, Zhang Q, Chen W, et al. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70689.
- 12 Mitchison N. Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer [J]. J Exp Med, 1955, 102(2): 157-177.
- 13 Seton-Rogers S. Tumour immunology: An exhausting metabolic competition [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(10): 573.
- 14 Schmeel FC, Schmeel LC, Gast SM, et al. Adoptive immunotherapy strategies with cytokine-induced killer (CIK) cells in the treatment of hematological malignancies [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(8): 14632-14648.
- 15 Wongkajornsilp A, Sangsuriyong S, Hongeng S, et al. Effective osteosarcoma cytotoxicity using cytokine-induced killer cells pre-inoculated with tumor RNA-pulsed dendritic cells [J]. J Orthop Res, 2005, 23(6): 1460-1466.
- 16 Todorovic M, Mesiano G, Gammaitoni L, et al. Ex vivo allogeneic

- stimulation significantly improves expansion of cytokine- induced killer cells without increasing their alloreactivity across HLA barriers [J]. *J Immunother*, 2012, 35(7): 579-586.
- 17 Rosenberg S, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report [J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(25): 1676-1680.
- 18 Théoleyre S, Mori K, Cherrier B, et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5: 123.
- 19 Fritzsching B, Fellenberg J, Moskovszky L, et al. CD8(+)/FOXP3(+)-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non- survivors: a multicenter validated retrospective study [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(3): e990800.
- 20 Karimi S, Chattopadhyay S, Chakraborty NG. Manipulation of regulatory T cells and antigen-specific cytotoxic T lymphocyte-based tumour immunotherapy [J]. *Immunology*, 2015, 144(2): 186-196.
- 21 Wang W, Wang J, Song H, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 + 49G/A polymorphism is associated with increased risk of osteosarcoma [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011, 15(7/8): 503-506.
- 22 Liu S, Geng P, Cai X, et al. Comprehensive evaluation of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms in risk of bone sarcoma [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2014, 18(8): 574-579.
- 23 Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, et al. CTLA- 4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction [J]. *Int J Cancer*, 2005, 117(4): 538-550.
- 24 Lussier DM, O'Neill L, Nieves LM, et al. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD- 1/PD- L1 interactions [J]. *J Immunother*, 2015, 38(3): 96-106.
- 25 Lussier DM, Johnson JL, Hingorani P, et al. Combination immunotherapy with α -CTLA-4 and α -PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2015, 3: 21.
- 26 Sun C, Sun HY, Xiao WH, et al. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell- based immunotherapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(10): 1191-1199.
- 27 Kubista B, Trieb K, Blahovec H, et al. Hyperthermia increases the susceptibility of chondro- and osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated lysis [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(2A): 789-792.
- 28 Guma SR, Lee DA, Yu L, et al. Natural killer cell therapy and aerosol interleukin- 2 for the treatment of osteosarcoma lung metastasis [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(4): 618-626.
- 29 Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1777-1786.
- 30 Buddingh EP, Schilham MW, Ruslan SE, et al. Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL- 15- activated allogeneic and autologous NK cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(4): 575-586.
- 31 Kubo T, Shimose S, Matsuo T, et al. Interferon- α/β receptor as a prognostic marker in osteosarcoma [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(6): 519-526.
- 32 Zhao J, Wang M, Li Z, et al. Interferon- α suppresses invasion and enhances cisplatin- mediated apoptosis and autophagy in human osteosarcoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(3): 827-833.
- 33 Li Z, Xu Q, Peng H, et al. IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell- mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 496-503.
- 34 Pahl JH, Kwappenberg KM, Varypataki EM, et al. Macrophages inhibit human osteosarcoma cell growth after activation with the bacterial cell wall derivative liposomal muramyltripeptide in combination with interferon- γ [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33: 27.
- 35 Hirohashi Y, Torigoe T, Tsukahara T, et al. Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells [J]. *Cancer Sci*, 2015.
- 36 Kissick HT, Sanda MG. The role of active vaccination in cancer immunotherapy: lessons from clinical trials [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 35: 15-22.
- 37 Marcove RC, Southam CM, Levin A, et al. A clinical trial of autogenous vaccine in osteogenic sarcoma in patients under the age of twenty-five [J]. *Surg Forum*, 1971, 22: 434-435.
- 38 Southam CM, Marcove RC, Levin AG, et al. Proceedings: Clinical trial of autogenous tumor vaccine for treatment of osteogenic sarcoma [J]. *Proc Natl Cancer Conf*. 1972, 7:91-100.
- 39 Krishnadas DK, Shusterman S, Bai F, et al. A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE- A1, MAGE- A3 and NY- ESO- 1 for children with relapsed or therapy- refractory neuroblastoma and sarcoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(10): 1251-1260.
- 40 Domingo-Musibay E, Allen C, Kurokawa C, et al. Measles edmonston vaccine strain derivatives have potent oncolytic activity against osteosarcoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21(11): 483-490.
- 41 王臻, 彭磊, 肖毅, 等. 骨肉瘤细胞与活化B淋巴细胞融合疫苗的制备及其诱导的抗肿瘤活性 [J]. *中华骨科杂志*, 2001, 21(10): 622-625.
- 42 郝新保, 范清宇, 张殿忠, 等. 巨噬细胞融合瘤苗对大鼠骨肉瘤的主动性免疫治疗[J]. *第四军医大学学报*. 1999, 20(12):1042-1044.
- 43 Tanaka T, Yui Y, Naka N, et al. Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(4): 369-379.
- 44 Broadhead ML, Dass CR, Choong PF. Systemically administered PEDF against primary and secondary tumours in a clinically relevant osteosarcoma model [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(10): 1503-1511.
- 45 Seto M, Yamazaki T, Sonoda J, et al. Suppression of tumor growth and pulmonary metastasis in murine osteosarcoma using gene therapy [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(2): 337-340.
- 46 Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, et al. Cancer cells as targets for lentivirus- mediated gene transfer and gene therapy [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(6): 1753-1762.
- 47 Zhang Y, Yang CQ, Gao Y, et al. Knockdown of CXCR7 inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the PI3K/Akt and β -arrestin pathways [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 965-972.
- 48 Zhao Q, Wang C, Zhu J, et al. RNAi- mediated knockdown of cyclooxygenase2 inhibits the growth, invasion and migration of SaOS2 human osteosarcoma cells: a case control study [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 26.

(收稿日期:2015-10-12)

(本文编辑: 宇文培之)