

肿瘤内科学专题

• 专家述评 •



[专家介绍] 邓学文,男,博士,专业领域:内科学、肿瘤免疫学、再生医学。日本生物治疗研究所副所长;日本癌学会、日本癌免疫学会和日本生物治疗学会会员。主要致力于基础与临床的转化和应用研究,在淋巴细胞培养方法的研究开发、癌症免疫细胞治疗的研究、脂肪干细胞培养方法的研究以及再生医学应用、皮肤纤维母细胞培养方法以及再生美容的应用、细胞培养加工中心(cell processing center, CPC)的运营和管理方法等领域积累了丰富的经验,取得了丰硕的成果。发表学术论文 30 余篇,参加学会交流文章 50 余篇。细胞培养的方法已申请专利,获得国际专利 1 项,日本专利 4 项。是世界上无需滋养细胞激活自然杀伤(natural killer, NK)细胞大量扩增培养技术的发明人、开发者。该技术操作简单,为世界上最

为安全有效的 NK 细胞培养方法。

肿瘤免疫治疗时代的 NK 细胞治疗

邓学文[△], 卢进, 张礼, 照沼裕

135-0051 东京,日本生物治疗研究所(邓学文);610041 成都,四川省肿瘤医院·研究所,四川省癌症防治中心,电子科技大学医学院 肿瘤内科中心(卢进、张礼);100-0004 东京,东京诊所(照沼裕)

[摘要] 近年来,全球刮起了一场肿瘤免疫治疗“风暴”。肿瘤的免疫治疗发展迅猛,并迅速成为研究热点。在人体自然免疫中, NK 细胞是重要组成成分,并且 NK 细胞在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。本文就 NK 细胞治疗的最新研究进展做一综述。

[关键词] 癌;免疫治疗;NK 细胞

[中图分类号] R730.51 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.002

引文格式: Deng XW, Lu J, Zhang L, et al. Cancer immunotherapy using NK cells[J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(9):749-755.

[邓学文,卢进,张礼,等. 肿瘤免疫治疗时代的 NK 细胞治疗[J]. 肿瘤预防与治疗,2019,32(9):749-755.]

Cancer Immunotherapy Using NK Cells

Deng Xuewen, Lu Jin, Zhang Li, Terunuma Hiroshi

Biotherapy Institute of Japan, Tokyo 135-0051, Japan (Deng Xuewen); Medical Oncology Center, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China (Lu Jin, Zhang Li); Tokyo Clinic, Tokyo 100-0004, Japan (Terunuma Hiroshi)

Corresponding author: Deng Xuewen, E-mail: tohxuewen@bij-net.com

[Abstract] In recent years, a global ‘storm’ of cancer immunotherapy has been launched. Cancer immunotherapy has developed rapidly and has become a research hotspot. In human natural immunity, natural killer (NK) cells are an important component, and NK cells play an important role in the occurrence and development of cancer. This article reviews the latest research progress of NK cell therapy.

[Key words] Cancer; Immunotherapy; NK cells

1 肿瘤免疫治疗

手术、化疗和放疗作为肿瘤三大标准治疗方法,在提高肿瘤病人生存率、延长生存时间方面发挥着重要作用。但是,根治肿瘤之路依然任重道远,迫切

[收稿日期] 2019-05-15 **[修回日期]** 2019-08-27

[通讯作者] [△]邓学文, E-mail: tohxuewen@bij-net.com

需要开发新的治疗方法。2013 年,美国科学杂志发布肿瘤免疫治疗时代来临^[1]。近年来,免疫治疗作为肿瘤第四治疗方法,正在快速发展并受到极大关注。免疫治疗不同于传统标准治疗直接杀伤癌细胞,而是通过激活机体免疫系统来驱除和消灭癌细胞。

目前,免疫治疗包括以 CTLA-4 和 PD-1 为代表的免疫检查点抑制剂和免疫细胞治疗。研究 CTLA-4 的美国人詹姆斯·艾莉森和研究 PD-1 的日本人本庶佑获得 2018 年诺贝尔生理学/医学奖,这不仅是对他们研究成绩的肯定,更充分证明了肿瘤免疫治疗的前景和价值。有人把 CTLA-4 和 PD-1 在肿瘤治疗领域的成功与抗菌素史上发现青霉素比肩,预示着免疫治疗肿瘤的新纪元。因此,我们可以大胆预测,今后将会出现越来越多利用免疫原理的抗肿瘤药物。免疫细胞治疗包括多种不同细胞类别。目前,美国食品药品监督管理局已批准了树突状细胞疫苗(Sipuleucel-T)治疗前列腺癌和 CAR-T 细胞治疗

小儿 B 细胞白血病和淋巴瘤。随着研究的进展,将会开发出更多肿瘤免疫治疗的细胞制剂。

2 自然杀伤(natural killer, NK)细胞

NK 细胞是淋巴细胞的一种,发现于二十世纪七十年代中期,因不需要预先致敏直接杀伤癌细胞而命名^[2]。NK 细胞是自然免疫的重要成分,通过直接攻击应急的、感染的和变质的细胞,对机体保持内环境稳定发挥着重要作用^[3-4]。

NK 细胞占外周血淋巴细胞的 10% ~ 20%^[5],其表现型为 CD3⁻CD14⁻CD19⁻CD56⁺CD16⁺。目前,一般通过流式细胞仪测定 NK 细胞(图 1)。NK 细胞根据 CD56 分子发现强度和 CD16 分子表达又可进一步分为功能不同的两个亚型^[6-7]。CD56^{dim}CD16⁺ NK 细胞占外周血液和脾脏 NK 细胞的 90%,主要以细胞杀伤功能为主,CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK 细胞主要分布在淋巴结,以产生细胞因子、免疫调节功能为主^[6,8]。

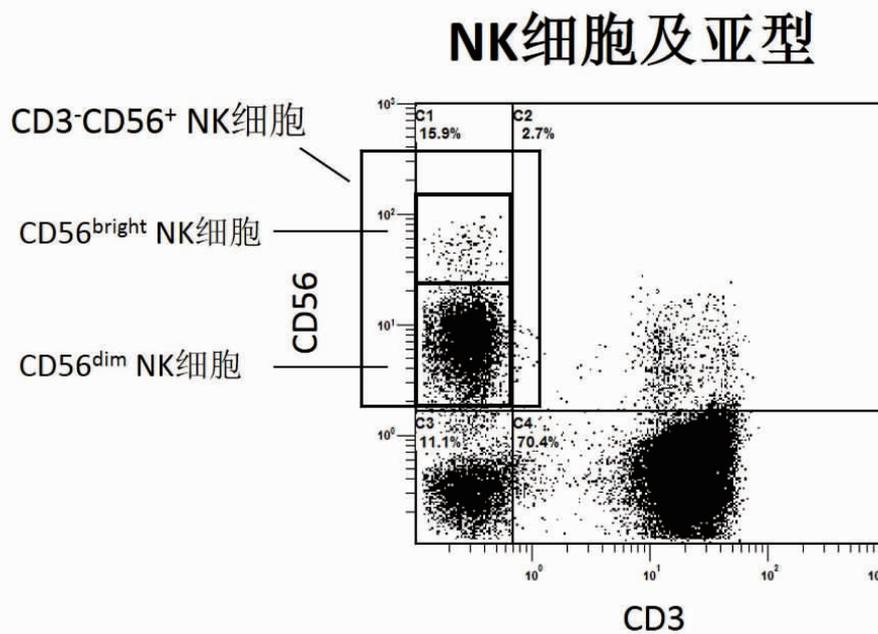


图 1 流式细胞仪测定的外周血 NK 细胞

从外周血中分离单个核白细胞,用 CD3 荧光抗体和 CD56 荧光抗体染色后,BECKMAN COULTER FC500 流式细胞仪测定,CYTOMICS CXP 软件分析 NK 细胞及其亚型。横轴为 CD3 抗体荧光强度,纵轴为 CD56 抗体荧光强度。在淋巴细胞集团中,CD3 阴性 CD56 阳性细胞集团为 NK 细胞。NK 细胞中 CD56 荧光表达弱的细胞集团为 CD56^{dim} NK 细胞亚型;CD56 荧光表达强的细胞集团为 CD56^{bright} NK 细胞亚型。

NK 细胞的功能活动取决于 NK 细胞表面活化受体和抑制性受体刺激信号的强弱对比,当活化信号强于抑制性信号时,NK 细胞就活性化,反之就处于抑制状态。每个 NK 细胞表面至少发现有一个抑制性受体,这些抑制性受体主要包括 Killer-Ig-Like Receptors(KIRs)和 CD94-NKG2A 异聚体,它们

分别认识细胞表面的组织相容性抗原 HLA-I 和 HLA-E,以保护正常细胞不受 NK 细胞伤害^[9-10](图 2)。NK 细胞通过抑制性受体识别靶细胞,同时,抑制性信号在 NK 细胞成熟过程中给与其功能训练^[11-12]。没有受到抑制性信号刺激的 NK 细胞是低反应细胞。只有经过自己组织相容性抗原抑制性信

号刺激的 NK 细胞才赋予其功能^[13-14]。因此, NK 细胞识别癌细胞, 病毒感染细胞主要是由于这些细胞的组织相容性抗原 MHC- I 表达减弱或消失(图 2)。当然, 仅有 MHC- I 表达减弱或消失还不足以活化 NK 细胞^[14]。

NK 细胞活化受体包括 NKG2D, 以及自然活性受体(natural cytotoxicity receptors, NCRs) NKp46, NKp44 和 NKp30 等^[15]。当 NKG2D 与靶细胞表面的糖蛋白 MICA、MICB 或 ULBPs 结合, 或 NCRs 与

硫酸肝素结合时, 就会启动 NK 细胞内活性信号^[16-17]。癌变细胞表面活化受体表达增强就会激活 NK 细胞发挥免疫监视效应, 使之发现和清除新发生的癌细胞。特别是当癌细胞 MHC- I 表达降低并同时表达活性受体, NK 细胞识别癌细胞并活化, 进而释放穿孔素和颗粒酶, 启动癌细胞凋亡和杀伤机制^[18]。同时, 活化了的 NK 细胞还会释放 IFN γ 、TNF α 等细胞因子, 不但协同杀伤癌细胞, 还可以活化其它免疫细胞, 增强免疫防御能力(图 2)。

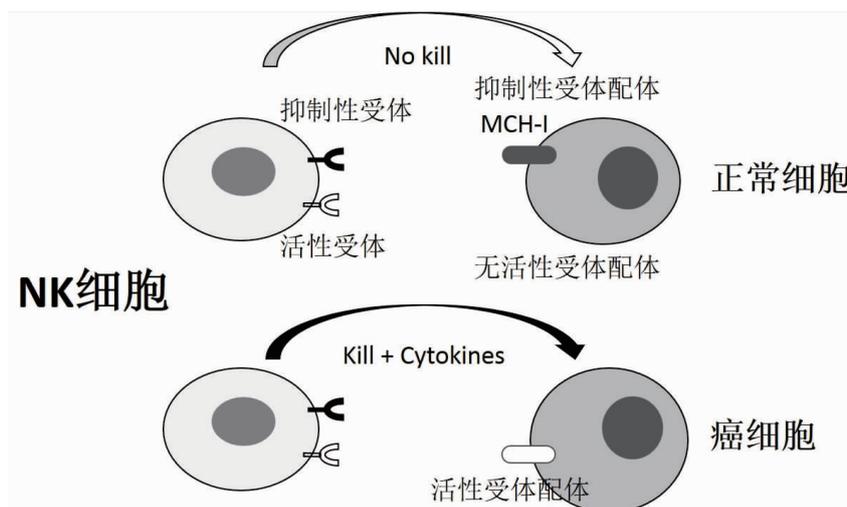


图 2 NK 细胞识别正常细胞和癌细胞

上图, 正常细胞表达抑制性受体配体 MHC-I 而无活性受体配体表达, 因此, NK 细胞功能被抑制, 不会杀伤正常细胞。下图, 癌细胞抑制性受体配体 MHC-I 表达消失并且表达活性受体配体, 因此, NK 细胞活化, 直接杀伤癌细胞, 同时释放细胞因子活化免疫反应。

3 NK 细胞与癌症的发生和进展

动物模型研究表明, 癌症发生率在缺失 NK 细胞的鼠比野生鼠更高^[19-20]。使用缺失获得性免疫功能的鼠模型证明, NK 细胞具有肿瘤免疫监视和免疫编辑作用^[21]。日本研究人员 Imai 等^[22] 对 3625 名日本居民随访 11 年发现, NK 细胞活性低的人群比中或高人群患癌风险明显增高。我们对乳腺癌的研究也表明, 乳腺癌病人的 NK 细胞活性明显低于健康人, 有转移的乳腺癌病人 NK 细胞活性进一步降低^[23]。胃癌^[24]、大肠癌^[25] 和肾癌^[26] 等的临床病理研究表明, 癌组织中 NK 细胞浸润的多寡与病人预后有关, NK 细胞浸润越多预后越好。因此, NK 细胞在癌症的发生和进展中发挥着重要作用。

4 外科手术与 NK 细胞功能

手术作为实体瘤的主要治疗方法, 在肿瘤治疗中发挥着重要作用。但是, 肿瘤病人手术后的复发和转移, 严重影响病人长期生存的事实不可否认, 并

早已引起广泛关注^[27-28]。Demichi 等回顾分析了 1 173 名接受了手术治疗的乳腺癌病人和 250 名非手术乳腺癌病人的生存时间, 发现手术病人有两个死亡高峰, 分别出现在第 3 年和第 8 年, 而非手术病人只有一个死亡高峰出现在第 4 年^[29-30]。因此, 部分病人甚至可能因为手术而加速肿瘤的复发和转移, 导致病人生存时间缩短。动物研究表明, 手术促进癌细胞转移, 降低生存率^[31-32], 其原因部分与手术本身有关。近年研究表明, 免疫细胞功能障碍与手术后复发转移密切相关^[33-34]。

NK 细胞作为先天性免疫细胞, 在外伤、手术以及危重状态时会出现严重的功能障碍^[33, 35-36]。NK 细胞功能障碍的程度和时间与损伤强度有关。NK 细胞功能障碍可以是一过性的, 但其生物学影响则可能长期持续, 包括对感染和损伤修复的影响^[37-38]。研究表明, 手术切除实体瘤可能增加肿瘤复发、转移甚至死亡风险^[39-40]。早在 1913 年就已观察到肿瘤手术切除与转移的关系^[27], 但是直到近年的研究才发现细胞免疫功能障碍在其中所扮演的角

色^[33-34]。特别是围手术期 NK 细胞功能障碍与肿瘤手术后的复发和转移密切相关^[33-34]。研究表明, NK 细胞功能在手术后第 1 天已经降低, 并与肿瘤的转移程度相关^[31]。肿瘤病人复发率也与术后 NK 细胞功能障碍程度密切相关^[41]。因此, 在围手术期使用增强免疫功能的细胞因子, 如 IL-2、GM-CSF、TNF α 、IFN α 等可以降低手术后肿瘤的复发和转移^[42-43]。鉴于这些细胞因子都有增强 NK 细胞活性的功能, 进一步验证了 NK 细胞在防御肿瘤手术后复发和转移中的作用。

手术后 NK 细胞功能障碍的机制复杂, 涉及手术后血液高凝状态, 释放抗炎性反应因子和免疫抑制性细胞增加等^[44]。对这些机制的深入研究, 将有利于开发肿瘤围手术期免疫治疗的新方法, 降低肿瘤手术后的转移和复发, 提高肿瘤病人治疗效果和预后。

5 活性化 NK 细胞治疗

基于 NK 细胞的肿瘤免疫作用, 特别是不受组织相容性抗原和肿瘤抗原限制直接杀伤癌细胞的特性, 自然会想到使用 NK 细胞治疗肿瘤^[45-46]。由于外周血中 NK 细胞数量少, 肿瘤病人 NK 细胞活性降低, 因此需要在体外扩增和活性化 NK 细胞^[46]。国际上报道了一些 NK 细胞活性化培养方法, 其中

多数需要使用滋养细胞刺激培养, 为临床转化应用和监管带来了一些难度^[46]。日本开发了一种不使用滋养细胞培养 NK 细胞的技术, 并已做成试剂盒 (BINKIT[®]) 在国际上推广使用^[47]。BINKIT[®] 操作简单, 可以从外周血单个核细胞中直接培养活性化 NK 细胞, 在 2 至 3 周内使外周血 NK 细胞活性化扩增上千倍^[48]。BINKIT[®] 培养的 NK 细胞高表达活性受体, 并且细胞因子产生能力比培养前的 NK 细胞明显提高, 对癌细胞的杀伤活性也明显增强^[48]。同时, 培养 NK 细胞的细胞杀伤活性明显强于培养 $\gamma\delta$ T 细胞和培养 $\alpha\beta$ T 细胞^[49]。因此, 培养 NK 细胞是非特异性免疫细胞治疗的首选。培养 NK 细胞静脉注射后可使体内免疫活性化, 外周血 NK 细胞活性增强^[47]。使用 BINKIT[®] 培养自己 NK 细胞开展肿瘤免疫细胞治疗, 在日本一般是每 2 至 3 周治疗 1 次 (图 3), 6 次为一个疗程。近 10 年就有超过 6 万人次以上 NK 细胞治疗, 除偶有发热等不良反应外, 没有需要治疗的副作用发生, 证明 NK 细胞治疗的临床安全性。NK 细胞治疗通常与树突状细胞治疗, 温热治疗和低剂量化疗联合应用, 已观察到可以延长进展期胰腺癌的生存时间^[50], 以及提高乳腺癌单抗治疗效果等作用^[51]。随着治疗案例的累积, NK 细胞治疗的效果将会得到进一步发挥和体现。

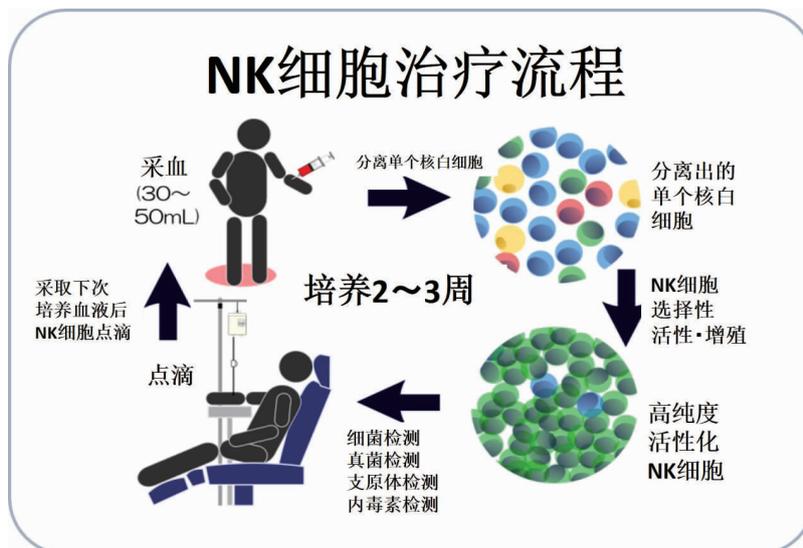


图 3 NK 细胞治疗流程模式图

一般 1 次采取 30mL ~ 50mL 外周血, 从中分离单个核白细胞, 选择性培养 NK 细胞。培养时间为 2 ~ 3 周。经过细菌, 真菌, 支原体和内毒素检测确定安全性后, 静脉点滴回输到病人体内。癌症病人治疗时一般 1 个疗程 6 次, NK 细胞回输前采取下次 NK 细胞培养的血液。

6 发挥 NK 细胞治疗作用的方法和策略

鉴于肿瘤病因/病理机制的复杂性, 使任何单一

肿瘤治疗方法都有其局限性。因此, 需要扬长避短, 综合治疗。手术是实体瘤的重要治疗方法, 特别是对减轻肿瘤负荷具有非常重要的作用^[52]。但是, 手

术本身以及其对机体免疫功能的影响,又可能引起和促进肿瘤的复发和转移^[39-40]。特别是围手术期 NK 细胞功能障碍与术后肿瘤复发/转移密切相关^[33-34],因此,尽量减少手术对机体免疫功能的影响,以及术后尽早提高和恢复免疫功能,包括开展 NK 细胞等免疫细胞治疗,对于预防和控制复发/转移,提高治疗效果具有积极意义^[31-33]。

近年来,分子靶向治疗的迅速发展,为肿瘤病人提供了新的治疗手段和希望^[53]。靶向药物包括阻断癌细胞表面信号的抗体和细胞内信号传递的药物。抗体药物不仅可以阻断细胞表面信号传递抑制癌细胞增殖,还可以通过其 Fc 激活免疫细胞,发挥抗体依存性细胞毒性活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)^[54]。NK 细胞表达 CD16 分子,可以与抗体 Fc 结合,是重要的 ADCC 效

应细胞^[54]。我们以表皮生长因子受体表达阳性的 A549 肺腺癌细胞株为靶细胞测定培养 NK 细胞的杀伤活性,即便 A549 细胞表达抑制性受体配体 MHC I,培养 NK 细胞仍然可以杀伤 A549 细胞,当同时添加西妥昔单抗时,则显著提高培养 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性(图 4)。因此可以期待,当抗体药物与 NK 细胞治疗联合应用时,可以发挥协同效应。临床上,我们也观察到曲妥珠单抗治疗耐药的乳腺癌病人,当联合 NK 细胞治疗后,其病情明显改善^[51]。另外,阻断癌细胞内信号传递的靶向药物,在抑制癌细胞增殖的同时,也使癌细胞表面 NK 细胞活化受体表达增强,有利于 NK 细胞发挥免疫监视作用^[55]。因此,分子靶向药物联合 NK 细胞治疗有望提高治疗效果,有待今后的临床研究。

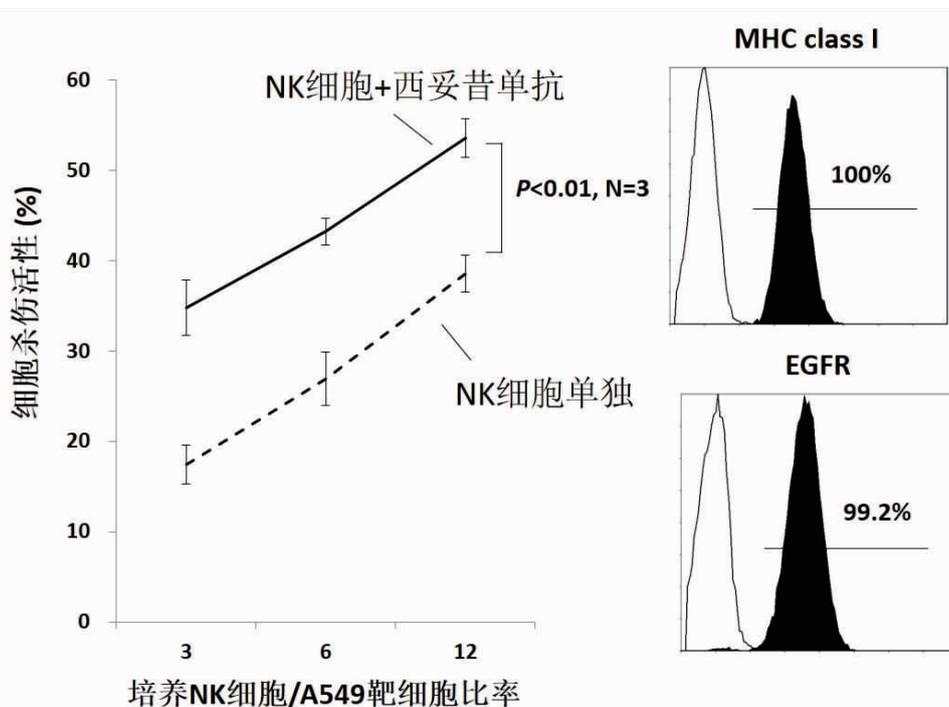


图 4 西妥昔单抗增强培养 NK 细胞杀伤癌细胞活性

右图,靶细胞 A549 肺腺癌细胞株表达 MHC-I 和表皮生长因子受体。左图,横轴为培养 NK 细胞与靶细胞的比率,纵轴为细胞杀伤活性。用 Calcein-AM 染色 A549 后,按一定比率与培养 NK 细胞共同培养。用 TERASCAN VP 测定培养前/后的荧光量,根据荧光量的变化计算出细胞杀伤活性。虚线为培养 NK 细胞单独杀伤 A549 的活性,实线为培养 NK 细胞与 A549 培养时添加西妥昔单抗后的细胞杀伤活性。西妥昔单抗明显增强培养 NK 细胞对 A549 的细胞杀伤活性。

肿瘤治疗的重点和难点在于复发和转移。其中上皮间叶转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤转移的重要机制^[56]。虽然 EMT 可以逃逸 T 细胞免疫^[57],但是其表达 NK 细胞活性分子,可以致敏 NK 细胞免疫监视机制^[58]。因此,增强 NK 细胞活性,包括 NK 细胞治疗,将有助于阻止和预防肿瘤的转移。

7 总结与展望

总之,随着肿瘤免疫研究的进展,今后将会有越来越多利用免疫机制的治疗药物和方法进入临床,造福肿瘤病人。NK 细胞作为可以直接杀伤癌细胞的免疫细胞,如何在肿瘤综合治疗中发挥作用,特别是对肿瘤微小病变,以及肿瘤复发/转移中发挥功

效,有待深入临床研究。

[参考文献]

- [1] Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2013, 342 (6165):1432-1433.
- [2] Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype [J]. *Eur J Immunol*, 1975, 5 (2):112-117.
- [3] Baginska J, Viry E, Paggetti J, et al. The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2013, 4 :490.
- [4] Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural killer cell immunomodulation: Targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6 :601.
- [5] Maghazachi AA. Compartmentalization of human natural killer cells [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42 (4):523-529.
- [6] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets [J]. *Trends Immuno*, 2001, 22 (11):633-640.
- [7] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9 (5):503-510.
- [8] Vivier E, Ugolini S. Regulatory natural killer cells: New players in the IL-10 anti-inflammatory response [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6 (6):493-495.
- [9] Bessoles S, Grandclément C, Alari-Pahissa E, et al. Adaptations of natural killer cells to self-MHC class I [J]. *Front Immunol*, 2014, 5 :349.
- [10] Zamai L, Ponti C, Mirandola P, et al. NK cells and cancer [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (7):4011-4016.
- [11] Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural killer cells in allogeneic transplantation: Effect on engraftment, graft-versus-tumor, and graft-versus-host responses [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15 (7):765-776.
- [12] Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules [J]. *Nature*, 2005, 436 (7051):709-713.
- [13] Tu MM, Rahim MMA, Sayed C, et al. Immunosurveillance and immunoeediting of breast cancer via class I MHC receptors [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5 (11):1016-1028.
- [14] Thomas LM, Peterson ME, Long EO. Cutting edge: NK cell licensing modulates adhesion to target cells [J]. *J Immunol*, 2013, 191 (8):3981-3985.
- [15] Langers I, Renoux VM, Thiry M, et al. Natural killer cells: Role in local tumor growth and metastasis [J]. *Biologics*, 2012, 6 :73-82.
- [16] Hecht ML, Rosental B, Horlacher T, et al. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8 (2):712-720.
- [17] Koch J, Steinle A, Watzl C, et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34 (4):182-191.
- [18] Bodduluru LN, Kasala ER, Madhana RM, et al. Natural killer cells: The journey from puzzles in biology to treatment of cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 357 (2):454-467.
- [19] Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma [J]. *Int Immunol*, 2001, 13 (4):459-463.
- [20] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells [J]. *J Exp Med*, 2000, 191 (4):661-668.
- [21] O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, et al. Cancer immunoeediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity [J]. *J Exp Med*, 2012, 209 (10):1869-1882.
- [22] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: An 11-year follow-up study of a general population [J]. *Lancet*, 2000, 356 (9244):1795-1799.
- [23] Dewan MZ, Takada M, Terunuma H, et al. Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in breast cancer patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63 (9):703-706.
- [24] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 88 (3):577-583.
- [25] Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma [J]. *Cancer*, 1997, 79 (12):2320-2328.
- [26] Donskov F, von der Maase H. Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (13):1997-2005.
- [27] Tyzzer EE. Factors in the production and growth of tumor metastases [J]. *J Med Res*, 1913, 28 (2):309-332.
- [28] Dominici L, Najita J, Hughes M, et al. Surgery of the primary tumor does not improve survival in stage IV breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 129 (2):459-465.
- [29] Bloom HJ. The natural history of untreated breast cancer [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1964, 114 (2):747-754.
- [30] Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85 (4):490-492.
- [31] Tai LH, de Souza CT, Bélanger S, et al. Preventing postoperative metastatic disease by inhibiting surgery-induced dysfunction in natural killer cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (1):97-107.
- [32] Tai LH, Tanese de Souza C, Sahi S, et al. A mouse tumor model of surgical stress to explore the mechanisms of postoperative immunosuppression and evaluate novel perioperative immunotherapies [J]. *J Vis Exp*, 2014, (85):51253.
- [33] Angka L, Khan S, Kilgour M, et al. Dysfunctional natural killer cells in the aftermath of cancer surgery [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8):1787.
- [34] Ananth AA, Tai LH, Lansdell C, et al. Surgical stress abrogates pre-existing protective T cell mediated anti-tumor immunity leading to postoperative cancer recurrence [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (5)

- : e0155947.
- [35] Blazar BA, Rodrick ML, O' Mahony JB, et al. Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury [J]. *J Clin Immunol*, 1986, 6 (1) :26-36.
- [36] Kim M, Kim M, Jeong H, et al. Hyporesponsiveness of natural killer cells and impaired inflammatory responses in critically ill patients [J]. *BMC Immunol*, 2017, 18 (1) :48.
- [37] Angka L, Martel AB, Kilgour M, et al. Natural killer cell IFN γ secretion is profoundly suppressed following colorectal cancer surgery [J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25 (12) :3747-3754.
- [38] van der Bij GJ, Oosterling SJ, Beelen RH, et al. The perioperative period is an underutilized window of therapeutic opportunity in patients with colorectal cancer [J]. *Ann Surg*, 2009, 249 (5) :727-734.
- [39] Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, et al. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19 (11) :1821-1828.
- [40] Baum M, Demicheli R, Hrushesky W, et al. Does surgery unfavourably perturb the "natural history" of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases? [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41 (4) :508-515.
- [41] Langers I, Renoux VM, Thiry M, et al. Natural killer cells: Role in local tumor growth and metastasis [J]. *Biologies*, 2012, 6 :73-82.
- [42] Jain A, Slansky JE, Matey LC, et al. Synergistic effect of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor vaccine and systemic interleukin-2 in the treatment of murine colorectal cancer hepatic metastases [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10 (7) :810-820.
- [43] Oosterling SJ, van der Bij GJ, Mels AK, et al. Perioperative IFN-alpha to avoid surgically induced immune suppression in colorectal cancer patients [J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21 (7) :753-760.
- [44] Market M, Baxter KE, Angka L, et al. The potential for cancer immunotherapy in targeting surgery-induced natural killer cell dysfunction [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 11 (1) :2.
- [45] Terunuma H, Deng X, Dewan Z, et al. Potential role of NK cells in the induction of immune responses; implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections [J]. *Int Rev Immunol*, 2008, 27 (3) :93-110.
- [46] Fang F, Xiao W, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer [J]. *Semin Immunol*, 2017, 31 :37-54.
- [47] Deng X, Ashiba K, Terunuma A, et al. Injection of ex vivo expanded NK cells activates NK cells in blood [J]. *Medical Science Digest*, 2015, 41 :318-321.
- [48] Deng X, Terunuma H, Nieda M, et al. Synergistic cytotoxicity of ex vivo expanded natural killer cells in combination with monoclonal antibody drugs against cancer cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14 (4) :593-605.
- [49] Deng X, Terunuma H, Terunuma A, et al. Ex vivo-expanded natural killer cells kill cancer cells more effectively than ex vivo-expanded $\gamma\delta$ T cells or $\alpha\beta$ T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22 (2) :486-491.
- [50] Terunuma H, Deng X, Nishino N, et al. NK cell-based autologous immune enhancement therapy (AIET) for cancer [J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2013, 9 (1) :9-13.
- [51] Takada M, Terunuma H, Deng X, et al. Refractory lung metastasis from breast cancer treated with multidisciplinary therapy including an immunological approach [J]. *Breast Cancer*, 2011, 18 (1) :64-67.
- [52] Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, et al. Excisional surgery for cancer cure; therapy at a cost [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4 (12) :760-768.
- [53] Berinstein NL, Grillo-López AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Oncol*, 1998, 9 (9) :995-1001.
- [54] Ochoa MC, Minute L, Rodríguez I, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity: Immunotherapy strategies enhancing effector NK cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95 (4) :347-355.
- [55] Ruscetti M, Leibold J, Bott MJ, et al. NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination [J]. *Science*, 2018, 362 (6421) :1416-1422.
- [56] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7 (2) :131-142.
- [57] Akalay I, Janji B, Hasmim M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (8) :2418-2427.
- [58] Chockley PJ, Chen J, Chen G, et al. Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (4) :1384-1396.