doi:10.11659/jjssx.08E024109

·基础研究·

CAR-NK细胞疗法通过调控PD-1/PD-L1轴抑制胃癌细胞异种移植瘤的生长

周京涛[1],刘 佳[2],努尔买买提·阿米都拉[1],刘园园[3] (1.新疆医科大学第七附属医院普外科,新疆 乌鲁木齐 830054;2.新疆维吾尔自治区第八人民医院骨科,新疆 乌鲁木齐 830000;3.新疆医科大学第七附属医院药学部,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的** 探讨嵌合抗原受体(CAR)-自然杀伤(NK)细胞疗法对胃癌细胞和异种移植瘤生长的作用和潜在机制。**方法** 细胞实验:将胃癌细胞系SGC7901和MGC803分别与CAR-NK细胞共培养作为CAR-NK组,将NK细胞分别与SGC7901和MGC803细胞共培养作为NK组,RT-qPCR检测2组细胞中PD-1和PD-L1的mRNA表达水平;用EdU染色法和CCK-8法检测细胞增殖能力;Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力,流式细胞术检测细胞周期变化,Western blot检测细胞中PD-1和PD-L1蛋白表达。动物实验:建立异种移植瘤小鼠模型,并分为空白对照组(接种常规培养的SGC7901细胞)、NK治疗组(联合接种SGC7901细胞和NK细胞)、CAR-NK治疗组(联合接种SGC7901细胞和CAR-NK细胞)、CAR-NK+rhPD-1治疗组(联合接种SGC7901细胞和CAR-NK细胞,同时腹腔注射rhPD-1 5 mg/kg)、CAR-NK+rhPD-L1治疗组(联合接种SGC7901细胞和CAR-NK细胞,同时腹腔注射rhPD-L1 5 mg/kg),每组5只。观察各组肿瘤体积并记录肿瘤质量,Western blot检测各组肿瘤组织中PD-1和PD-L1蛋白表达。**结果** 与NK组比较,CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞的增殖率、迁移和侵袭数均显著降低/减少($P<0.05$)。与NK组比较,CAR-NK组胃癌细胞S期数量增加($P<0.05$),G2/M期数量减少($P<0.05$)。与NK组比较,CAR-NK组SGC7901细胞中PD-1和PD-L1的mRNA表达量和蛋白表达量均明显下调($P<0.05$)。在异种移植瘤小鼠模型中,与NK治疗组比较,CAR-NK治疗组肿瘤组织中PD-1和PD-L1的蛋白表达量下调,肿瘤体积减小,肿瘤质量减轻,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照组比较,CAR-NK治疗组肿瘤组织中PD-1和PD-L1的蛋白表达量均下调,肿瘤体积减小,肿瘤质量减轻,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与CAR-NK治疗组比较,CAR-NK+rhPD-1治疗组肿瘤组织PD-1蛋白表达上调,且肿瘤体积增大,肿瘤质量增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与CAR-NK治疗组比较,CAR-NK+rhPD-L1治疗组肿瘤组织中PD-L1蛋白表达上调,且肿瘤体积增大,肿瘤质量增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CAR-NK细胞疗法对胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭有明显抑制作用,对胃癌细胞周期进程具有阻滞作用,其可能通过抑制PD-1/PD-L1轴抑制异种移植瘤的生长。

[关键词] 胃癌;CAR-NK细胞;PD-1;PD-L1;异种移植瘤;生长

[中图分类号] R735.2 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-08-27

CAR-NK cell therapy inhibits the growth of gastric cancer xenografts with gastric cancer cell by regulating the PD-1/PD-L1 axis

ZHOU Jing-tao[1], LIU Jia[2], Nuermaimaiti·Amidula[1], LIU Yuan-yuan[3] (1. Department of General Surgery, Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China; 2. Department of Orthopedics, Eighth People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang 830000, China; 3. Department of Pharmacy, Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of chimeric antigen receptor (CAR)-natural killer (NK) cell therapy on the growth of gastric cancer cells and xenograft tumors. **Methods** Cell experiments: The gastric cancer cell lines of SGC7901 and MGC803 were co-cultured with CAR-NK cells as the CAR-NK group, the NK cells were co-cultured with SGC7901 and MGC803 cells as the NK group, respectively. The mRNA levels of PD-1 and PD-L1 in both groups were detected by RT-qPCR. The cell proliferation ability was assessed using EdU staining and CCK-8 assay. The cell migration and invasion abilities were detected by Transwell assay. The change of cell cycle was detected by flow cytometry. The expression of PD-1 and PD-L1 proteins in cells was detected by Western blot. Animal experiments: Mice were established model of xenograft tumors and divided into the blank control group (inoculated with routinely cultured SGC7901 cells), NK treatment group (inoculated SGC7901 cells combined NK cells), CAR-NK treatment group (inoculated SGC7901 cells combined CAR-NK cells), CAR-NK+rhPD-1 treatment group (inoculated SGC7901 cells combined CAR-NK cells, with intraperitoneal injection of 5 mg/kg rhPD-1 concurrently), and CAR-NK+rhPD-L1 treatment group (inoculated SGC7901 cells combined CAR-NK cells, with intraperitoneal injection of 5 mg/kg rhPD-L1 concurrently), with 5 mice in each group. The tumor volume of each group was observed, the tumor weight was recorded, and the expression of PD-1 and PD-L1 proteins in the tumor tissue of each group were detected

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2021D01A175;2023D01A93)

[通信作者] 刘园园,E-mail:274528259@qq.com

by Western blot. **Results** Compared to the NK group, the CAR-NK group showed significantly decreased proliferation rate, and numbers of migration and invasion of SGC7901 and MGC803 cells ($P<0.05$). Compared to the NK group, the number of S phase cells increased, while G2/M phase cells decreased in the CAR-NK group ($P<0.05$). Compared to the NK group, the mRNA and protein expression levels of PD-1 and PD-L1 significantly downregulated in SGC7901 cell of the CAR-NK group ($P<0.05$). In the xenograft mouse model, compared to the NK treatment group, the protein expression of PD-1 and PD-L1 downregulated in the tumor tissues of the CAR-NK treatment group, with smaller tumor volume and decreased tumor weight, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared to the blank control group, the CAR-NK treatment group exhibited downregulated protein expression of PD-1 and PD-L1 in tumor tissues, reduced tumor volume, and decreased tumor weight, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared to the CAR-NK treatment group, the CAR-NK+rhPD-1 treatment group showed upregulated expression of PD-1 protein, large tumor volume, and increased tumor weight, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared to the CAR-NK treatment group, the CAR-NK+rhPD-L1 treatment group exhibited upregulated expression of PD-L1 protein, large tumor volume, and increased tumor weight, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** CAR-NK cell therapy have a significant inhibitory effect on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells, resulting in the gastric cancer cell cycle arrest, which may inhibit the growth of xenograft tumors by inhibiting the PD-1/PD-L1 axis.

Keywords: gastric cancer; CAR-NK cells; PD-1; PD-L1; xenograft tumors; growth

胃癌是我国最常见的癌症之一，患者生存率较低[1-2]。近几十年来，随着预防策略、饮食改善、根除幽门螺杆菌、早期诊断、手术技术标准化、辅助或新辅助化疗、靶向治疗（曲妥珠单抗）和免疫检查点抑制剂[程序性死亡受体-1/程序性死亡配体-1（programmed cell death 1/programmed death-ligand 1，PD-1/PD-L1）]的发展，晚期胃癌的发生率和病死率稳步下降[3]，但其5年生存率仍然很低[4]。因此，探索新的胃癌治疗策略极为必要。

嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor，CAR）-T细胞疗法在肿瘤治疗中显示出巨大的临床价值，特别是CD19-CAR-T细胞疗法在B细胞恶性肿瘤中的效果较好。然而，由于自体CAR-T细胞的分裂有限且寿命短，产生治疗剂量的自体CAR-T细胞耗时较长且困难[5]。此外，脱靶效应、细胞因子释放综合征（cytokine release syndrome，CRS）、移植物抗宿主病（graft-versus-host disease，GVHD）等风险以及其他不良反应，限制了CAR-T细胞疗法的进一步临床应用[6]。作为CAR-T细胞疗法的替代方案，CAR-自然杀伤（natural killer，NK）细胞疗法以靶向细胞上特定抗原的特点引起了广泛关注[6]。CAR-NK细胞疗法具有较多优点，经基因修饰的CAR-NK细胞可以靶向肿瘤细胞且无GVHD风险；CAR-NK细胞不仅能通过CAR特异性识别有抗原表达的肿瘤细胞发挥杀伤作用，同时还可利用其内在的NK受体及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性机制来清除肿瘤细胞，因而较少允许疾病通过肿瘤异质性或CAR抗原的下调逃逸[7]。此外，越来越多的研究已证明，NK细胞对于癌症的免疫治疗是安全的，可使更多患者受益[6,8-9]。然而，CAR-NK细胞疗法对胃癌的作用效果和机制尚未完全清楚，故本研究探讨CAR-NK细胞疗法对胃癌细胞异种移植瘤生长的抑制作用，并初步探讨其抗肿瘤机制，以期为胃癌的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

CAR-NK细胞、NK细胞、人胃癌细胞株SGC7901和MGC803购自武汉普诺赛细胞中心。重组人PD-1（recombinant human PD-1，rhPD-1）蛋白和重组人PD-L1（recombinant human PD-L1，rhPD-L1）蛋白均购自美国MCE公司。DMEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。青霉素-链霉素购自北京索莱宝公司。TRIzol®试剂购自美国Invitrogen公司。反转录试剂盒、SYBR Green Real-time试剂盒购自日本TaKaRa公司。GAPDH、PD-1、PD-L1的一抗和对应的二抗均购自英国Abcam公司。EdU检测试剂盒购自广州Ribobio公司。嵌入式细胞共培养体系和Transwell小室购自美国Merck公司。CCK-8增殖检测试剂盒购自上海Beyotime公司。Matrigel购自美国BD Biosciences公司。PVDF膜购自美国Millipore公司。增强型化学发光试剂盒购自美国ThermoFisher公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组处理 人胃癌细胞株SGC7901、MGC803在37 ℃、5%CO_2的湿润环境和DMEM培养基中培养，培养基中添加10%胎牛血清和100 U/mL青霉素-链霉素，细胞每24 h换液1次，48 h传代1次。待SGC7901和MGC803细胞生长到对数期，将胃癌细胞分为NK组和CAR-NK组。其中NK组利用嵌入式细胞共培养体系将NK细胞（1×10^5个/孔）分别与SGC7901（1×10^5个/孔）或MGC803（1×10^5个/孔）细胞共培养；CAR-NK组以同样的方式将CAR-NK细胞（1×10^5个/孔）分别与SGC7901（1×10^5个/孔）或MGC803（1×10^5个/孔）细胞共培养。待细胞共培养24 h后，收集各组胃癌细胞进行后续研究。

1.2.2 EdU染色法检测胃癌细胞增殖能力 NK组

和CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞经消化后接种于6孔板中(1×10⁶个/孔),然后每孔加入50 μmol/L EdU缓冲液,按照EdU试剂盒说明书在37 ℃下孵育2 h。DAPI细胞核染色15 min后,荧光显微镜下拍照。

1.2.3 CCK-8实验检测细胞增殖能力 NK组和CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞经消化后接种于6孔板(1×10⁶个/孔),继续用DMEM培养基常规培养,分别于第1、2、3、4天收集细胞,并按CCK-8试剂盒说明书用CCK-8试剂孵育细胞2 h后,测定450 nm波长处吸光度,实验重复3次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期变化 NK组和CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞重新孵育24 h,根据试剂盒说明书,细胞周期分析按照碘化丙啶细胞周期染色方案执行。采用FACSCanto™Ⅱ检测DNA含量。使用FCS Express 7 Flow软件分析细胞周期。

1.2.5 细胞划痕愈合实验检测细胞迁移能力 NK组和CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞经消化后接种于6孔板(1×10⁶个/孔),继续用DMEM培养基培养过夜形成细胞单层。在单层细胞上用200 μL无菌塑料枪头轻轻划线,显微镜下拍照;细胞在含2%胎牛血清的DMEM培养基中培养24 h后再拍照,测量图片中细胞划痕的距离。划痕愈合率(%)=(1−24 h划痕宽度/0 h划痕宽度)×100%。实验重复3次。

1.2.6 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力 迁移实验:NK组和CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞以0.8×10⁵接种到Transwell的上室,下室为DMEM培养基。24 h后固定迁移到上室底部的细胞,结晶紫染色并拍照、计数。侵袭实验Transwell上室的底部提前用Matrigel涂层,其余步骤与迁移实验一致。

1.2.7 RT-qPCR检测SGC7901细胞中PD-1和PD-L1 mRNA的表达 因SGC7901细胞的生长活力较MGC803细胞好,而且CAR-NK细胞疗法对SGC7901细胞划痕愈合的抑制效果较MGC803细胞明显,因此后续实验使用SGC7901细胞进行检测。用TRIzol®试剂提取NK组和CAR-NK组SGC7901细胞的总RNA,利用反转录试剂盒获得cDNA。采用SYBR Green Real-time试剂盒进行qPCR检测。以GAPDH为内参,采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算PD-1和PD-L1的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
PD-1	正向:CTTGGAGAGGACAGCAGGACAGT
	反向:CAGGAGCAGCAGAGATGTGTTAGC
PD-L1	正向:TGCCATGTAGACTACTTGAAG
	反向:ATGGTATATGACAAGCGAACACGG
GAPDH	正向:TGCCATGTAGACCCCTTGAAG
	反向:ATGGTACATGACAAGGTGCGG

1.2.8 异种移植瘤模型和分组 将25只8~10周龄的裸鼠[由新疆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(新)2023-0001;使用许可证号:SYXK(新)2023-0004]置于22~24 ℃、相对湿度30%~50%、光照-黑暗周期12 h的无特定病原级别的动物房内饲养。所有动物实验经新疆医科大学第七附属医院伦理委员会批准(批准号:20220427-03)。

将25只裸鼠按照随机数字表法分为空白对照组(于右肩胛骨皮下接种常规培养的1×10⁷个SGC7901细胞)、NK治疗组(于右肩胛骨皮下联合接种1×10⁷个SGC7901细胞和1×10⁷个NK细胞)、CAR-NK治疗组(于右肩胛骨皮下联合接种1×10⁷个SGC7901细胞和1×10⁷个CAR-NK细胞)、CAR-NK+rhPD-1治疗组[于右肩胛骨皮下联合接种1×10⁷个SGC7901细胞和1×10⁷个CAR-NK细胞,同时腹腔注射rhPD-1(5 mg/kg,每周1次)]、CAR-NK+rhPD-L1治疗组[于右肩胛骨皮下联合接种1×10⁷个SGC7901细胞和1×10⁷个CAR-NK细胞,同时腹腔注射rhPD-L1(5 mg/kg,每周1次)],每组5只。8周后对裸鼠进行安乐死,立即分离各组裸鼠肿瘤块,观察肿瘤体积并测定质量。

1.2.9 Western blot检测蛋白表达 从全细胞裂解物中提取NK组和CAR-NK组SGC7901细胞的总蛋白及从各组分离的肿瘤组织匀浆液中提取肿瘤组织的总蛋白。使用12% SDS-PAGE进行分离,转移到PVDF膜后,分别与PD-1一抗(1∶800)、PD-L1一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。然后用IgG偶联的二抗(1∶5 000)室温孵育2 h。所有条带均采用增强型化学发光试剂盒进行显色,并使用Image J软件对条带灰度值进行定量。

1.3 统计学分析

使用GraphPad PRISM 7.0软件进行统计学分析及制图。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间数据差异比较采用独立样本t检验,多组间数据差异采用单因素方差分析,多重比较采用*LSD-t*法。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAR-NK细胞对胃癌细胞的增殖影响

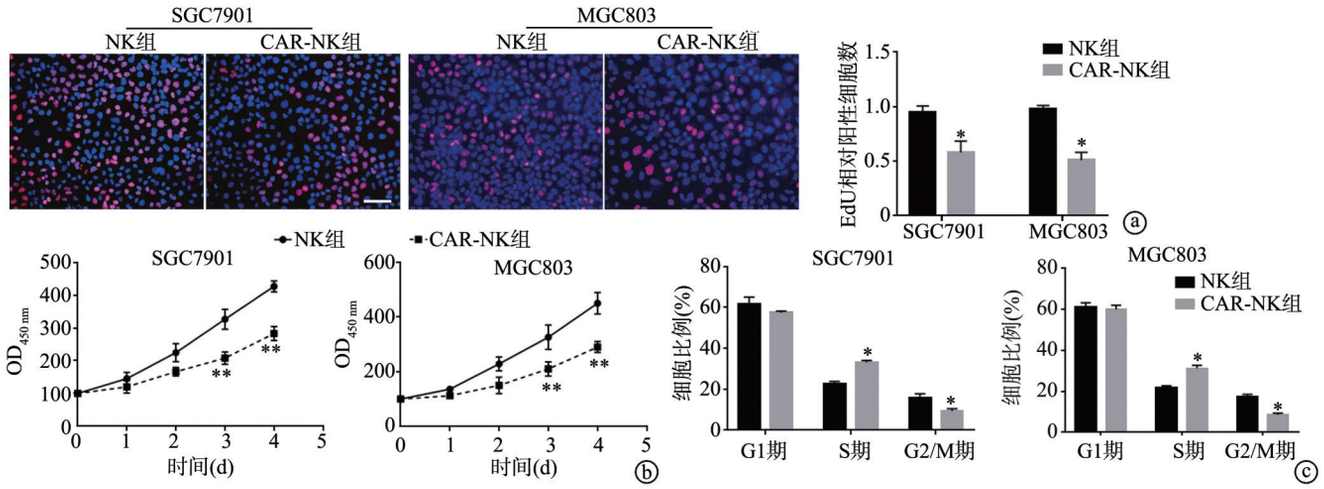
与NK组比较,CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞的增殖数明显减少($P<0.05$);与NK组比较,CAR-NK组2种细胞的增殖在3~4 d明显减慢($P<0.05$)。细胞周期检测结果显示,与NK组比较,CAR-NK组S期SGC7901和MGC803细胞数量增加,G2/M期SGC7901和MGC803细胞数量减少($P<0.05$),见图1。

2.2 CAR-NK细胞抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

与NK组比较，CAR-NK组SGC7901和MGC803细胞的划痕愈合率均降低（$P<0.05$），迁移和侵袭细胞数均减少（$P<0.05$），见图2。

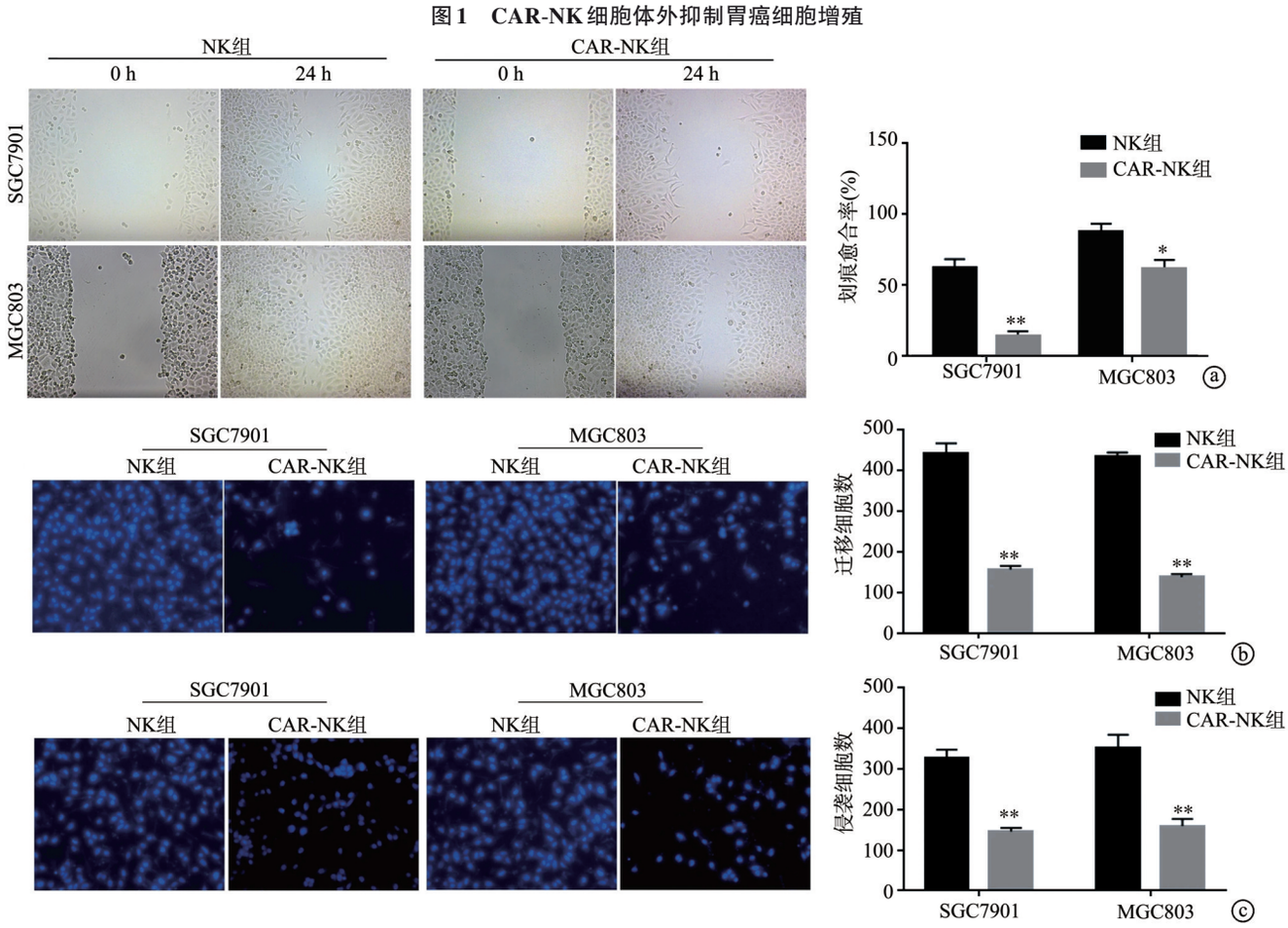
2.3 CAR-NK细胞抑制SGC7901细胞中PD-1和PD-L1的表达

与NK组比较，CAR-NK组SGC7901细胞中PD-1、PD-L1的mRNA和蛋白表达量均明显下调（$P<0.05$），见图3。



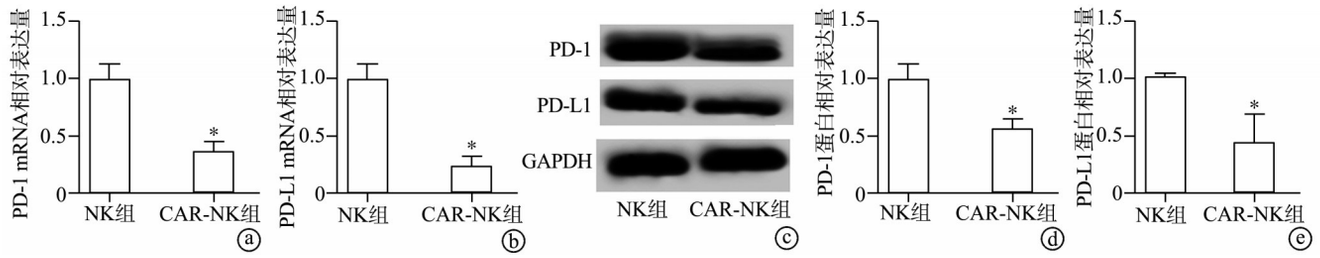
a：EdU免疫染色检测细胞增殖变化；b：细胞生长曲线；c：细胞周期检测 *：与NK组比较，$P<0.05$；**：与NK组比较，$P<0.01$

图1 CAR-NK细胞体外抑制胃癌细胞增殖



a：细胞迁移能力检测（×200）；b、c：Transwell实验检测细胞迁移、侵袭能力（×200） *：与NK组比较，$P<0.05$；**：与NK组比较，$P<0.01$

图2 CAR-NK细胞抑制胃癌细胞的迁移和侵袭



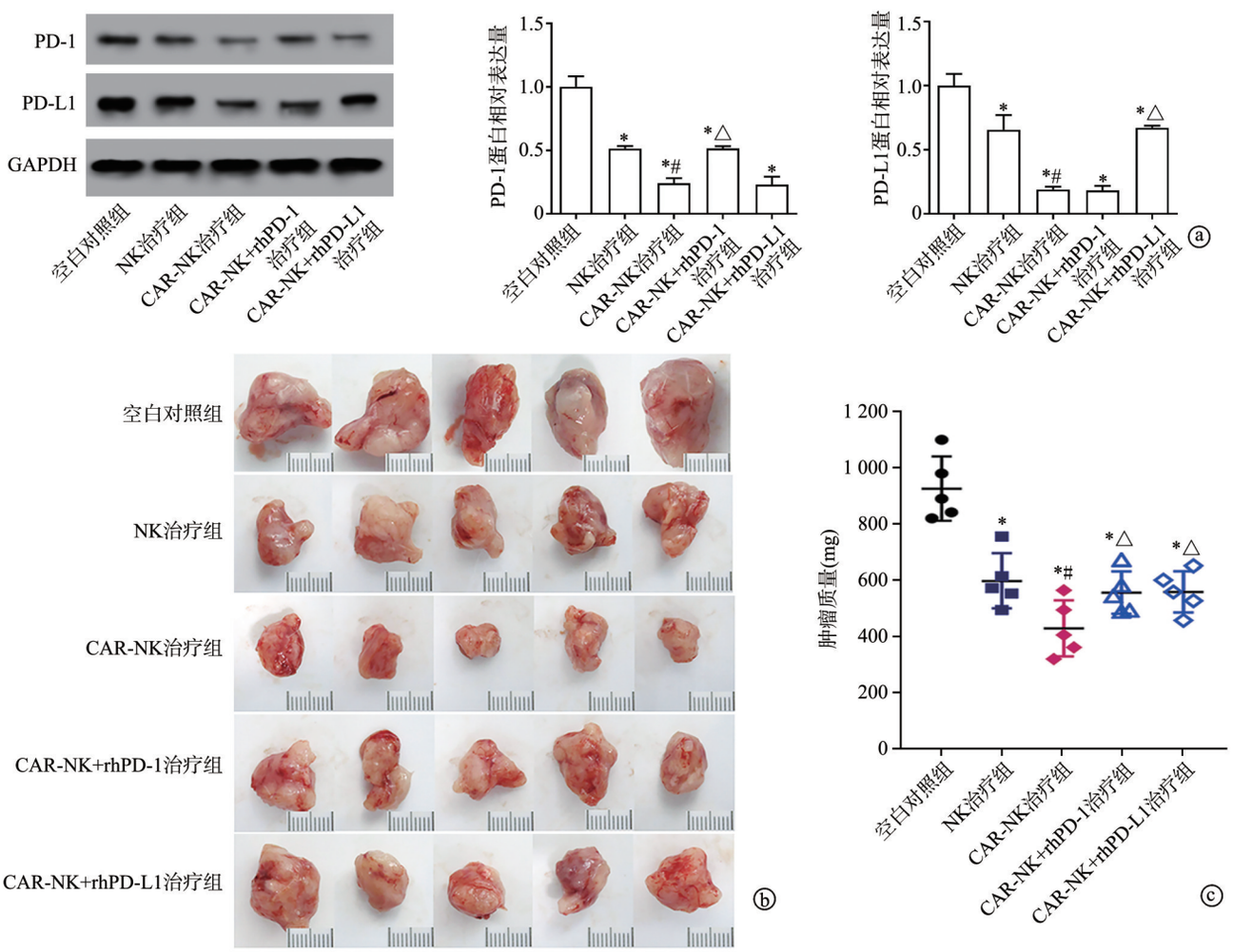
a~b:RT-qPCR检测PD-1和PD-L1 mRNA相对表达量;c~e:Western blot检测PD-1和PD-L1蛋白表达量　*:与NK组比较,$P<0.05$

图3　各组SGC7901细胞中PD-1和PD-L1的表达

2.4　CAR-NK细胞通过调控PD-1/PD-L1轴抑制体内移植瘤的生长

与空白对照组比较,CAR-NK治疗组肿瘤组织中PD-1和PD-L1蛋白表达均下调($P<0.05$);与NK治疗组比较,CAR-NK治疗组肿瘤组织中PD-1和PD-L1蛋白表达均下调($P<0.05$);与CAR-NK治疗组比较,CAR-NK+rhPD-1治疗组肿瘤组织中PD-1蛋白表达上调($P<0.05$);与CAR-NK治疗组比较,CAR-NK+rhPD-L1治疗组肿瘤组织中PD-1蛋白表达无显著变化($P>0.05$),而PD-L1蛋白表达上调($P<0.05$),见图4a。

与NK治疗组和空白对照组比较,CAR-NK治疗组肿瘤体积明显减小,肿瘤质量明显降低($P<0.05$)。与CAR-NK治疗组比较,CAR-NK+rhPD-1治疗组和CAR-NK+rhPD-L1治疗组肿瘤体积增大,肿瘤质量均明显增加($P<0.05$),见图4b、c。



a:Western blot检测小鼠肿瘤组织中PD-1和PD-L1蛋白表达;b、c:异种移植胃癌细胞和CAR-NK细胞8周后小鼠肿瘤体积及质量变化　*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与NK治疗组比较,$P<0.05$;△:与CAR-NK治疗组比较,$P<0.05$

图4　异种移植瘤小鼠模型中CAR-NK细胞对胃癌细胞体内生长的影响

3 讨论

胃癌是世界范围内发病率和病死率较高的常见恶性肿瘤之一[6,10],提高其诊断和治疗迫在眉睫。本研究重点探讨了CAR-NK细胞对胃癌细胞的杀伤作用,结果表明,CAR-NK细胞可抑制胃癌的生长、迁移和转移,提示CAR-NK细胞可作为胃癌的重要抗癌工具。

本研究为了模拟体内NK细胞与胃癌细胞的共存环境,将CAR-NK细胞与胃癌细胞系进行了共培养,并探讨CAR-NK细胞对PD-1/PD-L1轴的调控及抗肿瘤效果。结果显示,CAR-NK细胞显著抑制了胃癌细胞的增殖和转移,并下调了PD-1和PD-L1的表达;在体内异种移植瘤模型中,CAR-NK细胞同样抑制了肿瘤的生长,并降低了肿瘤组织中PD-1和PD-L1的表达;使用rhPD-1和rhPD-L1蛋白后,CAR-NK细胞的抑制作用被显著解除。以往的研究表明,PD-1/PD-L1在胃癌中表达上调[11],且抗PD-1/PD-L1的抗体能阻断多种癌症的进展[12-16],本研究结果与之一致。这证明了CAR-NK细胞可能通过抑制PD-1/PD-L1轴发挥抗肿瘤作用。因此,CAR-NK细胞在胃癌治疗中具有一定潜力,且PD-1/PD-L1轴可作为胃癌治疗的潜在靶点。

NK细胞的细胞毒性主要通过穿孔素和颗粒酶介导的细胞凋亡及抗体依赖性细胞毒性实现,在先天免疫中具有抗肿瘤等活性[17-20]。临床研究表明,NK细胞的过继性免疫细胞疗法是一种安全且耐受性良好的方法,可增强其细胞毒性,从而发挥对胃癌的治疗作用[21]。然而,肿瘤的免疫逃避限制了NK细胞在临床治疗中的应用[22]。因此,利用CAR进行基因操作,对NK细胞进行重编程从而增强其抗肿瘤功效尤为重要[23]。本研究证实了CAR-NK细胞在体内外均对胃癌细胞的生长存在明显的抑制作用,并且可以通过抑制胃癌细胞增殖,延缓肿瘤生长速度。因此,CAR-NK细胞在抑制胃癌方面具有显著的潜在效果。此外,本研究还发现,CAR-NK细胞对胃癌细胞周期具有明显阻滞作用,CAR-NK细胞可以促进胃癌细胞的S期细胞数量增加,G2/M期细胞数量减少,从而阻碍细胞的分裂和增殖,进一步强调了CAR-NK细胞对胃癌的细胞毒性作用。

癌细胞的迁移/转移潜力是影响NK细胞免疫治疗实体瘤疗效的一个重要因素[24]。因此,本研究在体外利用Transwell实验和划痕愈合实验评估了CAR-NK细胞对胃癌细胞迁移和侵袭的影响,结果显示,与CAR-NK细胞共培养导致胃癌细胞的迁移能力明显减弱;Transwell实验结果表明,CAR-NK细胞可以明显抑制胃癌细胞的侵袭。这表明,CAR-NK细胞不仅能够抑制胃癌细胞的迁移,还能够有效干预胃癌细胞的侵袭过程,从而减少对周围组织的侵害。

综上所述,CAR-NK细胞在胃癌治疗中展现出了多方面的抗肿瘤效果,包括抑制细胞增殖、降低迁移和侵袭能力及抑制肿瘤生长,为CAR-NK细胞在胃癌治疗中的应用提供了新的思路和可能性,未来有望成为一种有前景的免疫治疗手段。然而,仍需扩大癌细胞类型及肿瘤模型,并进行临床验证,以更全面地评估CAR-NK细胞在抗胃癌治疗中的潜力和可靠性。

[参考文献]

[1] López MJ, Carbajal J, Alfaro AL, et al. Characteristics of gastric cancer around the world[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2023, 181: 103841. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103841.

[2] Petryszyn P, Chapelle N, Matysiak-Budnik T. Gastric cancer: where are we heading? [J]. Dig Dis, 2020, 38(4): 280-285. doi: 10.1159/000506509.

[3] Rao X, Zhang C, Luo H, et al. Targeting gastric cancer stem cells to enhance treatment response [J]. Cells, 2022, 11(18): 2828. doi: 10.3390/cells11182828.

[4] Patel TH, Cecchini M. Targeted therapies in advanced gastric cancer [J]. Curr Treat Options Oncol, 2020, 21(9): 70. doi: 10.1007/s11864-020-00774-4.

[5] Long B, Qin L, Zhang B, et al. CAR T-cell therapy for gastric cancer: potential and perspective (review)[J]. Int J Oncol, 2020, 56(4): 889-899. doi: 10.3892/ijo.2020.4982.

[6] Cao B, Liu M, Huang J, et al. Development of mesothelin-specific CAR NK-92 cells for the treatment of gastric cancer[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(14): 3850-3861. doi: 10.7150/ijbs.64630.

[7] Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors[J]. N Engl J Med, 2020, 382(6): 545-553. doi: 10.1056/NEJMoa1910607.

[8] Kim R, An M, Lee H, et al. Early tumor-immune microenvironmental remodeling and response to first-line fluoropyrimidine and platinum chemotherapy in advanced gastric cancer[J]. Cancer Discov, 2022, 12(4): 984-1001. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0888.

[9] Saito H, Osaki T, Ikeguchi M. Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2012, 15(1): 27-33. doi: 10.1007/s10120-011-0059-8.

[10] Keshavjee SH, Moy RH, Reiner SL, et al. Gastric cancer and the immune system: the key to improving outcomes? [J]. Cancers, 2022, 14(23): 5940. doi: 10.3390/cancers14235940.

[11] Chen K, Wang X, Yang L, et al. The anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for gastric esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis and literature review[J]. Cancer Control, 2021, 28: 10732748219974 30. doi: 10.1177/1073274821997430.

[12] Chen Y, Gao M, Huang Z, et al. SBRT combined with PD-1/PD-L1 inhibitors in NSCLC treatment: a focus on the mechanisms, advances, and future challenges[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 105. doi: 10.1186/s13045-020-00940-z.