

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 放射性核素靶向治疗联合 PD-L1 免疫治疗的实验研究

赵亮¹ 富凯丽¹ 姚兰琳² 林秋明¹ 郭志德³ 文雪君³

陈小元⁴ 吴华² 孙龙² 林勤¹ 陈皓鋆²

¹厦门大学附属第一医院放射治疗科 361003; ²厦门大学附属第一医院核医学科、闽南 PET 中心 361003; ³厦门大学分子影像暨转化医学研究中心 361102; ⁴美国国立卫生研究院、生物医学影像与生物工程研究所、分子影像和纳米医学研究中心, 美国马里兰州贝塞斯达 20892

通信作者: 陈皓鋆, Email: leochen0821@foxmail.com

【摘要】目的 探讨基于靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的放射性核素靶向治疗 (TRT) 联合基于程序性死亡受体蛋白配体 1 (PD-L1) 的免疫治疗的抗肿瘤疗效及其潜在机制。**方法** 制备可特异性靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的分子探针¹⁷⁷Lu-伊文思蓝(EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD), 并测定其放射性比活度与放化纯。建立结肠癌 MC38 荷瘤鼠模型, 进行生物分布及 microSPECT 显像研究。通过监测小鼠肿瘤体积和体质量变化来评估疗效与安全性(各组 n=9); 采用流式细胞术分析 A 组(对照组; 生理盐水治疗)、B 组(¹⁷⁷Lu-EB-RGD 单药治疗, 18.5 MBq)、C 组(PD-L1 抗体单药治疗, 10 mg/kg) 和 D 组(联合治疗, 18.5 MBq ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 与 10 mg/kg PD-L1) 荷瘤鼠经治疗后肿瘤微环境(PD-L1⁺免疫细胞、CD8⁺T 细胞和调节性 T 细胞)的改变(各组 n=3)。采用重复测量方差分析、两独立样本 t 检验分析数据。**结果** ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 放射性比活度为 (55.85±14.00) GBq/ μ mol, 放化纯大于 95%。MicroSPECT 显像中, ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在荷瘤鼠肿瘤中清晰可见, 且摄取率高、滞留时间长, 注射后 24 h 肿瘤/肌肉比值达 14.87±0.88, 而在正常组织摄取及滞留较少; 生物分布结果显示, 注射后 4 h ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 较 ¹⁷⁷Lu-RGD 表现出明显增高的肿瘤摄取 [(12.00±1.60) 和 (3.69±0.37) 每克组织百分注射剂量率 (%ID/g); t=8.63, P<0.01]。在治疗开始后第 6 天, A~D 各组小鼠肿瘤体积差异有统计学意义 (F=7.32, P=0.03), 在监测时间内, D 组平均肿瘤体积最小, 治疗效果最好, 7/9 的荷瘤鼠表现为完全缓解, 且未出现肿瘤复发。流式细胞术结果显示, TRT 可导致肿瘤微环境中 PD-L1 表达上调, B 组与 A 组 PD-L1⁺免疫细胞数差异有统计学意义 (CD45⁺/PD-L1: 2.34% 与 0.95%, CD11b⁺/PD-L1: 2.41% 与 0.66%; t 值: 11.17 和 8.70, 均 P<0.01), 而免疫治疗及联合治疗使 C、D 组微环境中的 CD8⁺T 细胞浸润较 A 组急剧增加 (2.07% 与 0.26%, 2.71% 与 0.26%; t 值: 4.10 和 6.03, 均 P<0.05)。**结论** TRT 联合免疫治疗可协同增强抗肿瘤疗效, 有望应用于可接受 TRT 的转移性肿瘤患者的治疗。

【关键词】 结肠肿瘤; 伊文思蓝; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; 镓; 程序性细胞死亡受体 1; 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金(81701736, 81772893)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191128-00278

Enhancement of therapeutic efficacy by combination of integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotherapy and anti-PD-L1 immunotherapy: a preclinical study

Zhao Liang¹, Fu Kaili¹, Yao Lanlin², Lin Qiuming¹, Guo Zhide³, Wen Xuejun³, Chen Xiaoyuan⁴, Wu Hua², Sun Long², Lin Qin¹, Chen Haojun²

¹Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

²Department of Nuclear Medicine & Minnan PET Center, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; ³Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China; ⁴Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland MD 20892, USA

Corresponding author: Chen Haojun, Email: leochen0821@foxmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the therapeutic efficacy and potential mechanisms of integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radionuclide therapy (TRT) in combination with anti-programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1) immunotherapy. **Methods** Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted molecule Arg-Gly-Asp (RGD) was conjugated

with Evans blue (EB) and then labeled with ^{177}Lu to obtain ^{177}Lu -EB-RGD. The radioactivity and radiochemical purity were determined. MicroSPECT imaging, biodistribution, and *in vivo* therapeutic efficacy were subsequently performed in MC38 murine colon cancer models. Volume of tumor and body mass of mice were observed to assess the therapeutic efficacy and safety ($n=9$ in each group). Flow cytometry was used to evaluate therapy response of saline-treated (control, group A), 18.5 MBq ^{177}Lu -EB-RGD-treated (group B), 10 mg/kg PD-L1 antibody-treated (group C), TRT combined with immunotherapy-treated (group D, 18.5 MBq ^{177}Lu -EB-RGD and 10 mg/kg PD-L1 antibody) mice and alterations in tumor microenvironment (PD-L1 $^+$ immune cells, CD8 $^+$ T cells and regulatory T cells). Independent-sample *t* test and repeated measures analysis of variance were used for data analysis. **Results** The radioactivity of ^{177}Lu -EB-RGD was (55.85±14.00) GBq/ μmol . SPECT imaging clearly visualized the MC38 tumors in mice models with high uptake and long retention time, the tumor/muscle ratio reached 14.87±0.88 at 24 h postinjection, while less uptake and retention in normal tissues. Tumor uptake of ^{177}Lu -EB-RGD was significantly higher than that of ^{177}Lu -RGD 4 h post-injection ((12.00±1.60) vs (3.69±0.37) %ID/g; *t*=8.63, *P*<0.01). The efficacy results between each treatment group was significantly different (*F*=7.32, *P*=0.03) at day 6 post-treatment. The combination therapy showed the most outstanding anti-tumor efficacy with 7/9 mice showed complete response. Flow cytometry results showed that TRT up-regulated the PD-L1 expression significantly, namely, PD-L1 $^+$ immune cells in group B and group A were significantly different (CD45 $^+$ /PD-L1: 2.34% vs 0.95%, CD11b $^+$ /PD-L1: 2.41% vs 0.66%; *t* values: 11.17 and 8.70, both *P*<0.01); immunotherapy and combination therapy dramatically stimulated the infiltration of CD8 $^+$ T cells (2.07% vs 0.26%, 2.71% vs 0.26%; *t* values: 4.10 and 6.03, both *P*<0.05). **Conclusion** TRT in combination with immunotherapy synergistically enhance anti-tumor efficacy, which is expected to play a role in the treatment of patients with advanced tumor where TRT can be applied.

【Key words】 Colonic neoplasms; Evans blue; Arginine-glycine-aspartic acid; Lutetium; Programmed cell death 1 receptor; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81701736, 81772893)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20191128-00278

近年来,以程序性死亡受体 1(programmed cell death protein 1, PD-1)及其配体(PD ligand 1, PD-L1)抗体为代表的免疫治疗极大地改变了人们对肿瘤治疗领域的认识。其通过解除机体的免疫抑制,进而调动机体自身免疫系统达到治疗肿瘤的目的^[1]。免疫治疗目前已经在诸多恶性肿瘤治疗中取得成功,特别是黑色素瘤、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌以及淋巴瘤^[2-5]。基于这些研究,美国食品与药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)目前已经批准了派姆单克隆抗体(简称单抗)(Pembrolizumab)、纳武单抗(Nivolumab)、阿特珠单抗(Atezolizumab)等一批 PD-1/PD-L1 免疫治疗抗体在晚期 NSCLC 和其他恶性肿瘤治疗中的应用^[6]。尽管 PD-1/PD-L1 抗体可以长期控制甚至治愈一些晚期肿瘤,但其起效较慢,治疗费用高,且在实体瘤中只有 15%~40% 的客观反应率(objective response rate, ORR)^[7],这些不足阻碍了其进一步的临床应用。

目前学者们正在研究多种提高免疫治疗有效性的策略。主要方法之一是开发可预测对免疫治疗应答的生物标志物,而另一种方法是开发合理的联合治疗策略。黑色素瘤、结肠癌和乳腺癌的临床前研究已证实,放射治疗联合靶向 PD-1/PD-L1 抗体治疗可增强全身抗肿瘤能力^[8-9]。这些研究表明,一

方面放射治疗诱导局部炎性反应的同时在肿瘤微环境中可上调 PD-L1 的表达;另一方面,受放射治疗杀伤的肿瘤细胞可以充当“原位疫苗”,释放肿瘤的免疫原性抗原^[10],甚至产生放射治疗远隔效应。因此,放射治疗结合免疫治疗很可能发挥“1+1>2”的效果。2017 年, PACIFIC 研究(a global study to assess the effects of MEDI4736 following concurrent chemoradiation in patients with stage III unresectable non-small cell lung cancer)表明Ⅲ期不可切除局部晚期 NSCLC 患者在标准含铂方案同步放化疗结束后,使用德瓦鲁单抗(Durvalumab; PD-L1 抗体)序贯联合治疗,明显改善了患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)^[11],改写了Ⅲ期不可切除 NSCLC 患者的治疗指南,该研究的升级版研究(同步放化疗的同时联合免疫治疗)的Ⅲ期临床试验正在进行中。

放射性核素靶向治疗(targeted radionuclide therapy, TRT)以靶向肿瘤受体的多肽探针或纳米颗粒为载体,利用受体-配体特异性结合的原理将放射性核素载送到肿瘤部位,对肿瘤进行特异性和靶向性杀伤^[12]。与外照射放疗不同,TRT 可通过静脉注射进行全身给药,用于治疗全身多发转移的肿瘤病灶。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列的肽特异性靶向细胞表面受体整合素

$\alpha_v\beta_3$, 该整合素在多种恶性肿瘤中高表达^[13-14]。本课题组的前期研究结果证实, 将 RGD 多肽与白蛋白结合基团伊文思蓝 (Evans blue, EB) 的化学偶联 (称为 EB-RGD), 可显著提高其肿瘤摄取和在肿瘤中的滞留时间^[15]。本研究将基于靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的 TRT 与基于 PD-L1 的免疫治疗相结合, 旨在探讨这种联合治疗方案能否协同增强抗肿瘤疗效及其潜在机制。

材料与方法

1. 主要试剂和材料。PD-L1 抗体 (Cat. No. BP0101) 购于美国 Bioxcell 公司; 胎牛血清、细胞培养液 PRMI 1640 及青霉素、链霉素购于美国 Gibco 公司; 双功能螯合剂 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA)、RGD 环肽 c (RGDfK)、RGD-SH 购于中国中肽生化有限公司; 截短的 EB (truncated-EB, tEB) 和顺丁烯二酰亚胺-tEB 由美国国立卫生研究院陈小元教授惠赠; 放射性核素¹⁷⁷Lu (纯度>99%) 购于德国 ITG 公司; 单抗均购自美国 BD Pharmingen 公司。微量冷冻台式离心机 (Fresco 21) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SPECT/CT 仪 (nanoScan) 购自匈牙利 Mediso 公司; Micro-PET 仪购自德国 Siemens 公司 (Invenon); γ 计数器 (WIZARD 2480) 购自美国 Perkin-Elmer 公司。鼠源结肠癌细胞株 MC38 购于中国国家实验细胞资源共享平台。实验小鼠 C57BL/6(雌性, 6~7 周龄, 体质量 15~20 g, 63 只) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK(京)2019-0009], 饲养于厦门大学实验动物中心, 无特殊病原体级环境饲养。

2. MC38 荷瘤鼠模型的建立。将 MC38 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养液培养, 置于含体积分数 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱。取 100 μ l 细胞悬液 (1×10^6 个细胞/L) 皮下注射于提前 1 d 右下肢脱毛的 C57BL/6 小鼠。当小鼠肿瘤体积约 100 mm³ 时 (种植肿瘤细胞后第 7 天), 开始用于治疗的研究。当小鼠肿瘤体积约为 200 mm³ 时 (种植肿瘤细胞后第 12 天), 用于显像及生物分布的研究。所有动物实验均经过厦门大学实验动物中心实验动物管理与伦理委员会的审查和批准 (伦理编号: XMULAC20170063)。

3. EB-RGD 的合成及放射性核素标记。EB-RGD 的合成参考文献[15], 通过将 tEB 分子连接至

赖氨酸间隔基、将螯合剂连接至 α -端、将马来酰亚胺连接至 ε -端, 并将硫醇化的 RGD 肽连接至马来酰亚胺, 制得 DOTA-tEB-c (RGDfK), 简称 EB-RGD。使用 4 ml HCl (0.05 mol/L) 稀释 1.85 GBq ¹⁷⁷LuCl₃, 将 100 μ g EB-RGD 或 RGD 溶解于 1 ml NH₄OAc (0.25 mol/L) 中, 分别加入¹⁷⁷LuCl₃; 将混合物在 90 °C 下加热 30 min, 使用 C18 柱 (美国沃特世科技有限公司) 纯化, 并通过 0.22 μ m 无菌滤膜 (美国 Merck Millipore 公司); 将 1 ml 体积分数 60% 乙醇通过 C18 柱和无菌滤膜注入产品容器, 然后加入 5 ml 生理盐水, 使尾静脉注射时溶液中的乙醇体积分数约为 10%。使用分析型薄层色谱法测定放化纯 (美国 Bioscan AR-2000 放射性薄层色谱仪)。

4. MicroSPECT 显像及生物分布研究。取体质量及肿瘤大小相近的雌性 MC38 荷瘤鼠 8 只, 分为 2 组, 每组 4 只, 经尾静脉分别注射约 18.5 MBq/只的¹⁷⁷Lu-EB-RGD 或¹⁷⁷Lu-RGD。于注射后 4、24、48 及 72 h 行静态全身 microSPECT 显像, 由四探头 SPECT/CT 仪完成, 获得 SPECT 图像的每个截面扫描 25~60 s, 总体扫描时间为 25~60 min (窗口宽度: 20%, 矩阵: 256×256, 中等缩放)。采集数据后通过软件 (Tera-TomoTM; SPECT/CT 仪内置软件) 使用 56.1、112.9 和 208.4 keV 的¹⁷⁷Lu γ 能量迭代重建 SPECT 数据; 使用 InVivoScope 软件 (美国 Bioscan 公司) 分析 SPECT 图像。

取体质量及肿瘤大小相近的雌性 MC38 荷瘤鼠 12 只, 经尾静脉注射 0.55 MBq¹⁷⁷Lu-EB-RGD, 分别于 4、24、48 及 72 h 后各处死 3 只, 另外再取 3 只 MC38 荷瘤鼠经尾静脉注射 0.55 MBq¹⁷⁷Lu-RGD, 并在 4 h 后处死。收集主要脏器称质量, 使用 γ 计数器测定其放射性计数, 结果表示为每克组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

5. TRT 与免疫治疗的联合治疗方案。取肿瘤体积和体质量相近的雌性荷瘤鼠 48 只, 分为 4 组, 每组 12 只 (9 只用于监测肿瘤体积和体质量, 3 只用于流式细胞术检测), 采用不同方案进行对照或治疗: A 组在治疗开始的第 0 天经尾静脉注射 100 μ l 生理盐水; B 组在治疗开始的第 0 天经尾静脉注射 18.5 MBq 的¹⁷⁷Lu-EB-RGD; C 组经尾静脉在治疗开始的第 0、3、6 天分别注射 10 mg/kg 的 PD-L1 抗体; D 组在治疗开始的第 0 天经尾静脉注射 18.5 MBq 的¹⁷⁷Lu-EB-RGD, 并且在治疗开始的第 1、4、7 天分别注射 10 mg/kg 的 PD-L1 抗体。每 2 d 监测 1 次

肿瘤体积和体质量,计算肿瘤体积大小(长径×短径×宽径/2)。A~D 组各取 3 只在开始治疗后第 3 天进行¹⁸F-脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG)microPET 显像,具体方案参照文献[16]。当出现以下症状时,立即停止对该小鼠的监测并将其麻醉处死:体质量减轻>15%;肿瘤体积>1 500 mm³;活动性溃疡。

6. 流式细胞术对肿瘤微环境的检测。剖离小鼠肿瘤组织并去除坏死组织和脂肪,将肿瘤组织切成小块(约 2 mm),置于含 1 g/L 胶原酶 IV(Cat. No. C5138;美国 Sigma-Aldrich 公司)和 0.1 g/L DNA 酶 I(Cat. No. D4527;美国 Sigma-Aldrich 公司)的组织消化液中,在 37 ℃下振荡 40 min。然后将细胞悬液通过细胞滤网过滤,用细胞染色缓冲液(Cat. No. 554656;美国 BD Pharmingen 公司)洗涤,300 ×g 离心 7 min,然后丢弃上清液,活细胞计数后重悬于细胞染色缓冲液中。在 100 μl(约 10⁶ 个细胞)细胞悬液中加入 1 μg 纯化的抗小鼠 CD16/CD32 单抗(Cat. No. 553141)于 4 ℃预温育 5 min 封闭 Fc 受体;再分别加入特异性抗小鼠 CD45、CD11b、PD-L1、CD3e 和 CD8α 的荧光抗体(Cat. No. 553018、557396、564715、553061 和 553032),2~8 ℃温育 30 min;然后将细胞在 2 ml 染色缓冲液中洗涤 2 次,350 ×g 离心 5 min。对调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)标记,在 CD4 抗体(Cat. No. 553051)染色后,叉头框蛋白(forkhead box protein 3, FOXP3)的染色(Cat. No. 563101;美国 BD Pharmingen 公司)根据细胞内染色方案进行。最后使用 NovoCyte 流式细胞仪(中国艾森生物有限公司)进行检测。具体检测指标包括 PD-L1⁺ 免疫细胞(CD45⁺/PD-L1, CD11b⁺/PD-L1)、CD8⁺ T 细胞(CD3⁺/CD8⁺)和肿瘤浸润 Tregs(CD4⁺/FOXP3⁺)。

7. 统计学处理。采用 IBM SPSS 19.0 软件分析

数据。符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验;多组间比较采用重复测量方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 放射性标记化合物的表征。¹⁷⁷Lu-EB-RGD 和¹⁷⁷Lu-RGD 的放射性比活度分别为(55.85 ± 14.00)和(18.60 ± 4.70) GBq/μmol,纯化后产物的放化纯均大于 95%。

2. 体内生物分布。MC38 结肠癌荷瘤鼠注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD 4、24、48 和 72 h 后行 microSPECT 显像(图 1A),结果示注射后 4 h 即可在肿瘤区域观察到较高的显像剂摄取,肿瘤/肌肉比值(tumor/muscle, T/M)为 9.03 ± 0.44 ,注射后 24 h 肿瘤摄取达到峰值($T/M = 14.87 \pm 0.88$),而后随时间变化轻度降低;肝肾有轻度的显像剂摄取,其摄取程度在注射后随时间变化逐渐降低。¹⁷⁷Lu-RGD 的 microSPECT 显像(图 1B)示¹⁷⁷Lu-RGD 在血液中被迅速清除,注射后 4 h 肿瘤摄取($T/M = 2.90 \pm 0.30$)明显低于¹⁷⁷Lu-EB-RGD($t=19.45, P<0.01$)。

¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在荷瘤鼠体内的分布情况具体见表 1。注射后 4 h,¹⁷⁷Lu-EB-RGD 主要积累在血液及富血供的脏器,如肝脾;此外,¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在肾中的高摄取证明其主要通过泌尿系统清除。注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD 后 24 h,肿瘤摄取达峰值,血液摄取值迅速降低。注射后 4 h,¹⁷⁷Lu-EB-RGD 较¹⁷⁷Lu-RGD 表现出明显增高的肿瘤摄取[(12.00 ± 1.60)和(3.69 ± 0.37)%ID/g; $t=8.63, P<0.01$],与 microSPECT 显像结果基本一致。

3. TRT 联合免疫治疗的协同效应。A~D 组荷瘤鼠体质量在治疗期间均未出现明显降低,表明

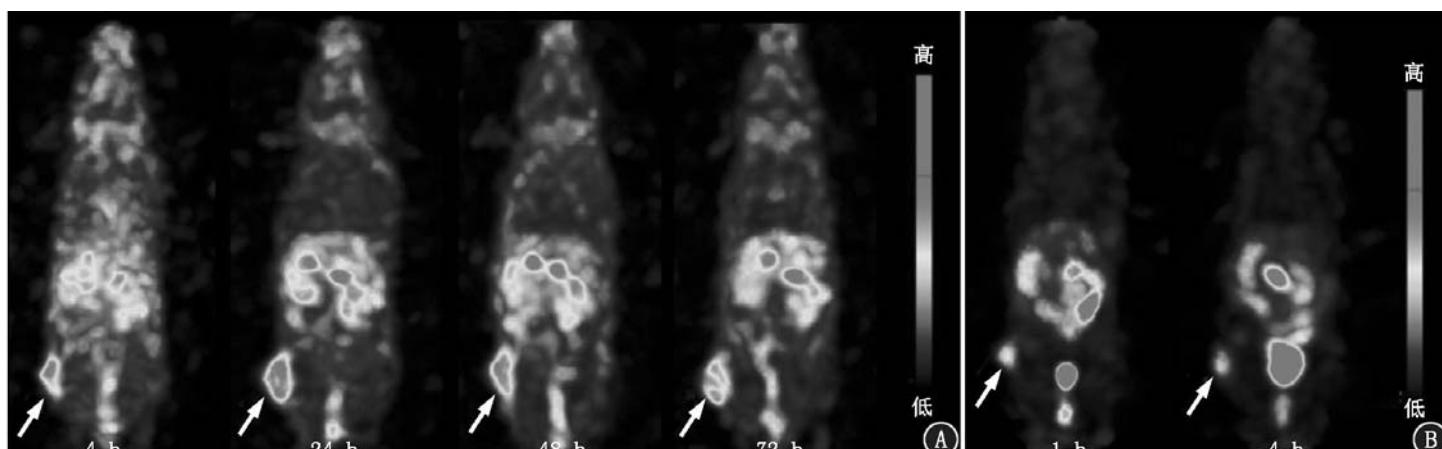


图 1 结肠癌 MC38 荷瘤鼠注射¹⁷⁷Lu-伊文思蓝(EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD; A)和¹⁷⁷Lu-RGD (B)后不同时间的 microSPECT 显像图(箭头示肿瘤)

表 1 ^{177}Lu -EB-RGD 在结肠癌 MC38 荷瘤鼠体内的生物学分布 (%ID/g; $\bar{x} \pm s$)

组织器官	注射后不同时间点的放射性摄取值			
	4 h	24 h	48 h	72 h
心脏	5.06±1.29	3.33±1.32	2.69±0.79	2.65±0.96
肝	10.29±2.33	10.92±5.77	8.63±2.21	9.79±1.22
肺	6.78±2.25	5.15±2.84	4.13±1.49	3.54±0.38
肾	14.55±2.09	18.13±4.87	13.80±2.73	13.71±2.95
脾	12.00±4.75	12.19±5.06	13.45±4.11	13.11±2.29
胃	3.68±1.59	3.48±1.67	2.05±0.48	1.98±0.69
骨	3.67±1.25	3.14±0.72	2.56±0.34	2.98±0.98
肌肉	2.14±0.49	1.90±0.67	1.44±0.58	1.26±0.31
小肠	4.14±0.92	6.08±3.89	5.56±2.57	4.91±0.98
血液	10.54±2.22	3.23±1.47	1.96±0.58	1.54±0.25
脑	0.48±0.10	0.45±0.19	0.37±0.12	0.35±0.06
肿瘤	12.00±1.60	14.78±4.74	14.26±2.74	9.77±1.28

注:各时间点小鼠数量为 3 只;%ID/g 为每克组织百分注射剂量率,EB 为伊文思蓝,RGD 为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸

TRT 并不会对小鼠造成严重的生物学毒性。4 组荷瘤鼠肿瘤生长曲线见图 2A。可见 A 组肿瘤快速增长,治疗后 24 d 肿瘤体积全部超过 1500 mm^3 ;B 组和 C 组肿瘤生长较 A 组明显延迟,各组干预措施与时间的交互作用对肿瘤体积的影响有统计学意义 ($F=13.32, P<0.01$)。在治疗开始后第 6 天,4 组间肿瘤体积的差异有统计学意义 ($F=7.32, P=0.03$),A 组大于 C 组和 D 组(均 $P<0.05$),B 组亦大于 C 组和 D 组(均 $P<0.05$)。在治疗开始后第 10 天,4 组间肿瘤体积的差异仍有统计学意义 ($F=13.47, P<0.01$),各治疗组两两比较的结果与第 6 天相似,但 B 组低于 A 组 ($P=0.02$),D 组开始低于 C 组 ($P=0.01$)。随后的监测时间内,D 组与 A、B、C 组间肿瘤体积的差异随时间逐渐增加;在 50 d 的监测时间内,D 组中有 2 只小鼠显示部分缓解,7 只小鼠显示

完全缓解且在监测时间内未出现肿瘤复发。在治疗第 3 天行 ^{18}F -FDG microPET 显像(图 2B),4 组肿瘤对 ^{18}F -FDG 的摄取差异有统计学意义 ($F=41.74, P<0.01$),B 组和 D 组肿瘤病灶对 ^{18}F -FDG 摄取较 A 组明显减少 [(5.86 ± 0.92)、(3.73 ± 0.38) 和 (8.72 ± 0.80) %ID/g, 均 $P<0.01$]。

4. 联合治疗增强抗肿瘤疗效的机制。使用流式细胞仪评估治疗第 4 天肿瘤微环境中的改变,结果显示,与 A 组相比,B 组的 PD-L1⁺ 免疫细胞 (CD45⁺/PD-L1 和 CD11b⁺/PD-L1) 数量明显增加 (2.34% 与 0.95%, 2.41% 与 0.66%; t 值: 11.17 和 8.70, 均 $P<0.01$), 而 C 组这 2 种细胞数量则明显下降 (0.43% 与 0.95%, 0.30% 与 0.66%; t 值: 4.56 和 3.61, 均 $P<0.05$), C 组和 D 组的 CD8⁺T 细胞数量较 A 组明显上升 (2.07% 与 0.26%, 2.71% 与 0.26%; t 值: 4.10 和 6.03, 均 $P<0.05$); 阻断抗肿瘤免疫反应的 Tregs 数量在各组中差异无统计学意义 ($P>0.05$), 结果表明 TRT 可上调肿瘤微环境中的 PD-L1 表达,PD-L1 免疫治疗和联合治疗可增加 CD8⁺T 细胞浸润。

讨 论

基于 PD-1/PD-L1 的免疫治疗在一些晚期肿瘤中展现出良好前景,促使研究者将其与传统治疗相结合以提升抗肿瘤效果。放射治疗在约 50% 的恶性肿瘤患者治疗中均有应用,可明显提高患者的生存^[17]。近年来,免疫治疗联合放射治疗在临床前研究及临床试验中虽已取得较大进展,然而两者的结合还存在一定的挑战,如如何抉择联合治疗的时机(序贯还是同步,序贯时先免疫治疗还是先放射治疗)、联合治疗中放射治疗的剂量(大分割还是常规分割)、如何通过分子标志物筛选合适的患者、如何

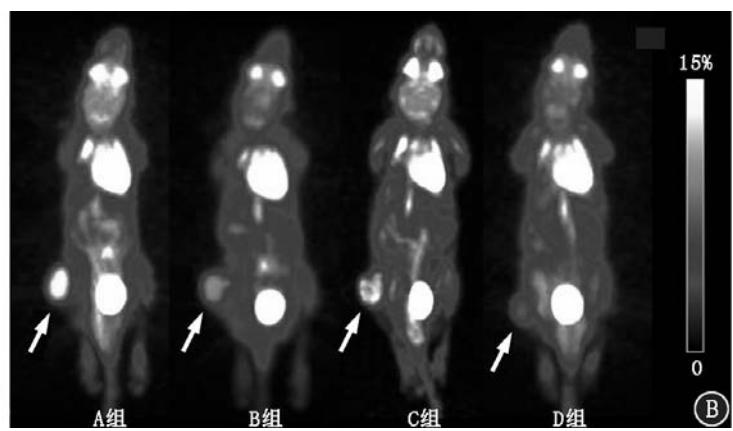
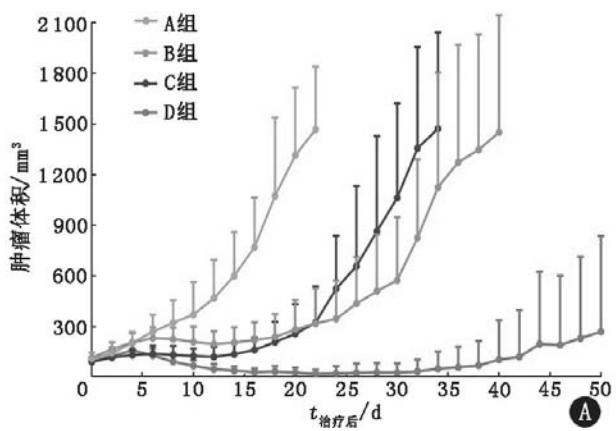


图 2 放射性核素靶向治疗 (TRT) 联合免疫治疗效果。 A. A~D 组结肠癌 MC38 荷瘤鼠肿瘤生长曲线; B. 治疗第 3 天各组荷瘤鼠 microPET 显像图(箭头示肿瘤)。A 组第 0 天经尾静脉注射 $100 \mu\text{l}$ 生理盐水; B 组第 0 天经尾静脉注射 18.5 MBq 的 ^{177}Lu -伊文思蓝 (EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD); C 组第 0、3、6 天经尾静脉注射 10 mg/kg 的程序性死亡受体蛋白配体 1 (PD-L1) 抗体; D 组第 0 天经尾静脉注射 18.5 MBq 的 ^{177}Lu -EB-RGD 联合第 1、4、7 天注射 10 mg/kg 的 PD-L1 抗体

降低不良反应的发生以及放射治疗对免疫系统(T 细胞)的杀伤作用。目前,PACIFIC 研究已经证实同步放化疗后序贯免疫治疗存在协同效应,可提高患者的 OS 和 PFS^[11];然而在放化疗时同步使用免疫治疗是进一步增强还是减弱两者之间的协同作用有待于 PACIFIC2 研究的结果证实。

TRT 是放射治疗的分支,其在晚期肿瘤中的研究及应用正逐渐增加,FDA 于 2018 年 1 月批准了¹⁷⁷Lu-DOTA-D-苯丙氨酸 1-酪氨酸 3-苏氨酸 8-奥曲肽(D-Phe1-Tyr3-Thr8-octreotide, TATE)(商品名 Lutathera)治疗生长抑素受体阳性的胃肠道神经内分泌肿瘤^[18]。TRT 与免疫治疗联合应用的研究却鲜有报道。2018 年,Choi 等^[19]首先报道了在 B16-F10 黑色素瘤模型中使用 TRT 和免疫治疗的联合治疗方案,其研究结果显示联合治疗的抗肿瘤效果优于单一治疗。然而,该研究中免疫治疗方案同时使用了 PD-1 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)2 种抗体,这 2 种免疫治疗抗体的联合使用会增加免疫治疗严重不良反应的发生率^[20],再联合 TRT 有可能会进一步增加不良反应。此外,该研究中使用¹⁷⁷Lu-DOTA-聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)₄-LLP2A 作为 TRT 的治疗载体{LLP2A=N-[4-[[(2-ethyl-phenyl) amino] carbonyl] amino] phenyl] acetyl]-N(epsilon)-6-[(2E)-1-oxo-3-(3-pyridinyl-2-propenyl)]-L-lysyl-L-2-aminohexanedioyl-(1-amino-1-cyclohexane) carboxamide},其肿瘤摄取率及在肿瘤中的滞留时间还有待进一步提高^[21],且其联合治疗组中并没有小鼠达到完全缓解。本研究结果表明,¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在 MC38 结肠癌模型鼠的肿瘤中表现出了较高的肿瘤摄取率和滞留时间,PD-L1 免疫治疗与¹⁷⁷Lu-EB-RGD 的联合使用大幅度提高了抗肿瘤效果(联合治疗组中 7/9 的荷瘤小鼠表现为完全缓解),且在 50 d 的监测期内均存活(9/9)。

本研究结果进一步表明,TRT 会引起肿瘤微环境中 PD-L1 的表达上调,而 PD-L1 上调会增加免疫抑制,促进肿瘤细胞发生免疫逃逸。因此,在 PD-L1 上调的这段时间窗内联合 PD-L1 免疫治疗能更好地提升其抗肿瘤疗效。此外,TRT 与 PD-L1 免疫治疗的联合可通过激活肿瘤微环境中的杀伤性 T 细胞来增强免疫应答。具有细胞毒性的 CD8⁺T 细胞是抑制肿瘤的重要 T 细胞,而 Tregs 是免疫抑制的关键介质,其负性调节杀伤性 T 细胞功能并促进肿瘤细胞免疫逃逸^[22]。本研究中,与单独接受 TRT

或免疫治疗的小鼠相比,接受联合疗法的小鼠肿瘤中 CD8⁺T 细胞数量的增加最为明显,而抑制性免疫细胞的数量却未见增加,表明 TRT 联合 PD-L1 免疫治疗可通过刺激 CD8⁺T 细胞浸润来改变肿瘤微环境并增强抗肿瘤免疫力。常规外照射除了直接辐照肿瘤浸润的 T 细胞外,辐射还可能杀伤流经放射治疗区域的外周血 T 细胞^[23],而放射性核素¹⁷⁷Lu 的射程较短,可能避免这一缺点,本研究中也未观察到 TRT 导致 CD8⁺T 细胞数量的减少。因此,TRT 联合 PD-L1 免疫治疗可产生较单一治疗更为强劲的抗肿瘤效果。

本研究存在一定局限性:首先,整个研究仅在 MC38 肿瘤模型中进行了测试,该模型通常是 PD-L1 表达且对 PD-1/PD-L1 抗体敏感的“热”肿瘤模型,后续需要增加更多肿瘤模型,如 PD-L1 低表达的“冷”肿瘤模型进行研究优化;其次,TRT 相较于常规放射治疗的优势在于治疗全身多发转移的肿瘤病灶,目前暂不能构建出全身多发转移的小鼠肿瘤模型进行研究;最后,本研究只重点关注了联合治疗的抗肿瘤疗效,并没有深入研究其机制,虽然进行了流式细胞技术检测,但以目前所采用的生物标志物检测去代表特定的细胞群体是不够的,后续需要更多的标志物检测且需进一步细化 T 细胞的亚群。TRT 联合免疫治疗的策略还有待更深入的研究,包括联合治疗的先后给药顺序、免疫治疗的最佳干预时机、除 PD-1/PD-L1 抗体以外其他有前景的免疫治疗方案[CD47、CTLA-4、淋巴细胞活化基因-3(lymphocyte activation gene-3, LAG-3)和纤维介素蛋白 1(fibrinogen-like protein 1, FGL1)抗体等]的选择等。

综上,本研究结果表明 TRT 可上调肿瘤微环境中 PD-L1 表达,且 TRT 与免疫治疗的联合治疗可增加 CD8⁺T 细胞浸润,重塑肿瘤的微环境并增强在 MC38 结肠癌模型中的抗肿瘤疗效。这种新型联合治疗策略有望在将来应用于可接受 TRT 的多发转移性肿瘤患者。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T cell co-receptors for cancer therapy[J]. Immunity, 2016, 44(5): 1069-1078. DOI:10.1016/j.jimmuni.2016.04.023.
- [2] Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, et al. FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma with disease progression on or after platinum-containing chemotherapy[J]. Oncologist, 2017, 22(7): 873-878. DOI:10.1634/theoncologist.2016-0496.

- [3] Ribas A, Hamid O, Daud A, et al. Association of Pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma [J]. *JAMA*, 2016, 315(15): 1600-1609. DOI:10.1001/jama.2016.4059.
- [4] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17): 1627-1639. DOI:10.1056/NEJMoa1507643.
- [5] Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(4): 311-319. DOI:10.1056/NEJMoa1411087.
- [6] Morgensztern D, Herbst RS. Nivolumab and Pembrolizumab for non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15): 3713-3717. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-2998.
- [7] Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? [J]. *J Immunother Cancer*, 2016, 4: 48. DOI:10.1186/s40425-016-0153-x.
- [8] Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer [J]. *Nature*, 2015, 520(7547): 373-377. DOI:10.1038/nature14292.
- [9] Teng F, Kong L, Meng X, et al. Radiotherapy combined with immune checkpoint blockade immunotherapy: achievements and challenges [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(1): 23-29. DOI:10.1016/j.canlet.2015.05.012.
- [10] Rodriguez-Ruiz ME, Rodriguez I, Garasa S, et al. Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on CD8 T cells and crosspriming [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 5994-6005. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-0549.
- [11] Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20): 1919-1929. DOI:10.1056/NEJMoa1709937.
- [12] Gill MR, Falzone N, Du Y, et al. Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(7): e414-423. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30379-0.
- [13] 吴江, 王新刚, 孙传金, 等. 新型 RGD 肽探针¹⁸F-阿法肽对乳腺癌的诊断价值 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(4): 207-211. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.004.
- Wu J, Wang XG, Sun CJ, et al. Diagnostic value of a novel RGD-peptide based tracer ¹⁸F-Alfatide II for breast cancer [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 39(4): 207-211. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.004.
- [14] 赵海涛, 翟洛萍, 高瀚男, 等. 靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的新型 isoDGR 多肽用于脑胶质瘤 SP ECT/CT 显像 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(11): 689-693. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.004.
- Zhao HT, Zhai LP, Gao HN, et al. A novel integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted isoDGR probe for SPECT/CT imaging of glioma [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2017, 37(11): 689-693. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.11.004.
- [15] Chen H, Jacobson O, Niu G, et al. Novel "add-on" molecule based on Evans blue confers superior pharmacokinetics and transforms drugs to theranostic agents [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58(4): 590-597. DOI:10.2967/jnumed.116.182097.
- [16] Wu H, Chen H, Pan D, et al. Imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1 positive gliomas with a novel fluorine-18 labeled RGD-ATWLPPR heterodimeric peptide probe [J]. *Mol Imaging Biol*, 2014, 16(6): 781-792. DOI:10.1007/s11307-014-0761-0.
- [17] Stapleton S, Jaffray D, Milosevic M. Radiation effects on the tumor microenvironment: implications for nanomedicine delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 109: 119-130. DOI:10.1016/j.addr.2016.05.021.
- [18] 刘会攀, 陈跃. 放射性核素诊治神经内分泌肿瘤的应用进展 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(9): 564-567. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.09.015.
- Liu HP, Chen Y. Application progress of radionuclide imaging and therapy in neuroendocrine tumors [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 39(9): 564-567. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.09.015.
- [19] Choi J, Beaino W, Fecek RJ, et al. Combined VLA-4-targeted radionuclide therapy and immunotherapy in a mouse model of melanoma [J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(12): 1843-1849. DOI:10.2967/jnumed.118.209510.
- [20] Wang DY, Salem JE, Cohen JV, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(12): 1721-1728. DOI:10.1001/jamaonc.2018.3923.
- [21] Beaino W, Nedrow JR, Anderson CJ. Evaluation of ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-DOTA-PEG₄-LLP2A for VLA-4-targeted PET imaging and treatment of metastatic melanoma [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(6): 1929-1938. DOI:10.1021/mp5006917.
- [22] Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, et al. Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications [J]. *Trends Immunol*, 2016, 37(11): 803-811. DOI:10.1016/j.it.2016.08.012.
- [23] Wang Y, Deng W, Li N, et al. Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: current challenges and future directions [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 185. DOI:10.3389/fphar.2018.00185.

(收稿日期:2019-11-28)