· 基础研究 ·

肿瘤浸润 CD8$^+$ T 细胞 SPECT/CT 显像预测抗 PD-1 免疫治疗疗效的小鼠实验

黎奎[1]　高立权[1]　杨秀杰[1]　宋瑞[1]　赵慧云[2]　刘昭飞[1]

[1]北京大学基础医学院放射医学系医学同位素研究中心,北京　100191;[2]北京大学医药卫生分析中心,北京　100191

通信作者:黎奎, Email: kuili@bjmu.edu.cn;赵慧云, Email: zhaohy@bjmu.edu.cn

【摘要】　目的　制备^{99}Tc^m-联肼尼克酰胺(HYNIC)-αCD8/Fab(^{99}Tc^m-αCD8/Fab)探针,并探讨其用于 SPECT/CT 显像以预测抗程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)免疫治疗疗效的价值。**方法**　合成前体 HYNIC-αCD8/Fab 和 IRDye800-αCD8/Fab(Dye-αCD8/Fab);以 $SnCl_2$ 为还原剂,进行^{99}Tc^m 与前体 HYNIC-αCD8/Fab 的标记反应,制备^{99}Tc^m-αCD8/Fab 探针,分析其标记率、放化纯及稳定性,并探究其与体外淋巴细胞结合的特异性。建立 BALB/c 小鼠 CT26 结直肠肿瘤模型,通过 SPECT/CT 显像分析^{99}Tc^m-αCD8/Fab 的体内特异性结合能力;对荷瘤小鼠行抗 PD-1 治疗,然后行近红外荧光成像及 SPECT/CT 显像,检测肿瘤 CD8$^+$ T 细胞浸润状况,并用 HE 染色和免疫荧光检测验证;经抗 PD-1 治疗后的荷瘤小鼠尾静脉给予抗 CD8 抗体,分析其损耗抗 PD-1 治疗疗效的情况。采用双因素方差分析进行组间差异比较。**结果**　^{99}Tc^m-αCD8/Fab 的标记率为 90%,放化纯为 95%,于 PBS 和胎牛血清(FBS)中放置 720 min,放化纯仍达 80%以上,稳定性良好;细胞结合实验显示,^{99}Tc^m-αCD8/Fab 与小鼠脾 CD8$^+$ T 细胞受体和人外周血 CD8$^+$ T 细胞受体结合值分别为(10.30±0.81)和(1.78±0.61)百分加入放射性剂量(%AD)/10^6 个细胞,过量冷 αCD8 抗体可导致结合值降低至(1.59±0.25) %AD/10^6 个细胞(F=10.07,P<0.001)。SPECT/CT 显像示,^{99}Tc^m-αCD8/Fab 在小鼠 CT26 结直肠肿瘤模型中具有良好的肿瘤摄取。近红外荧光成像示,对抗 PD-1 免疫治疗响应组小鼠肿瘤荧光强度为(8.9±1.1)%,明显高于非响应组的(7.1±0.8)%(F=4.69,P=0.024),SPECT/CT 显像同样显示响应组肿瘤摄取较高;HE 和免疫荧光结果表明,响应组肿瘤和淋巴结组织中淋巴细胞浸润比例明显高于非响应组。此外,CD8$^+$ T 细胞损耗显著削弱了抗 PD-1 治疗疗效。**结论**　成功制备了^{99}Tc^m-αCD8/Fab,该探针能对肿瘤浸润 CD8$^+$ T 细胞清晰显像;CD8 靶向 SPECT 显像对临床预测和评估免疫治疗疗效具有潜在的应用价值。

【关键词】　结直肠肿瘤;淋巴细胞, 肿瘤浸润;CD8 阳性 T 淋巴细胞;程序性细胞死亡受体 1;放射性核素显像;治疗结果;预测;小鼠

基金项目:北京市自然科学基金(JQ19026)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210705-00219

SPECT/CT imaging of tumor-infiltrating CD8$^+$ T cell to predict the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in mice

Li Kui[1], *Gao Liquan*[1], *Yang Xiujie*[1], *Song Rui*[1], *Zhao Huiyun*[2], *Liu Zhaofei*[1]

[1]*Medical Isotopes Research Center, Department of Radiation Medicine, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China*; [2]*Medical and Healthy Analytical Center, Peking University, Beijing 100191, China*

Corresponding authors: Li Kui, Email: kuili@bjmu.edu.cn; Zhao Huiyun, Email: zhaohy@bjmu.edu.cn

【Abstract】　Objective　To prepare ^{99}Tc^m-hydrazinonicotinamide (HYNIC)-αCD8/Fab (^{99}Tc^m-αCD8/Fab), and explore the predictive value of ^{99}Tc^m-αCD8/Fab SPECT/CT imaging for the efficacy of anti-programmed death-1 (PD-1) immunotherapy. **Methods**　The αCD8/Fab was modified with HYNIC-*N*-hydroxysuccinimide (NHS) and IRDye800-NHS to form HYNIC-αCD8/Fab and IRDye800-αCD8/Fab (Dye-αCD8/Fab), respectively. ^{99}Tc^m-αCD8/Fab was prepared in sodium bicarbonate buffer (pH=8.5), with $SnCl_2$ being used as the reducing agent. The labeling yield and radiochemical purity of ^{99}Tc^m-αCD8/Fab and its stability in PBS and fetal bovine serum (FBS) were tested *in vitro*. The mouse spleen and human peripheral blood lymphocytes were isolated for cell-specific binding and blocking experiments of ^{99}Tc^m-αCD8/Fab *in vitro*. SPECT/CT imaging was used to analyze the specific binding ability of the ^{99}Tc^m-αCD8/Fab probe in CT26 colon cancer mouse models (BALB/c). The near infrared fluorescence imaging and

SPECT/CT imaging were performed to detect the intra-tumoral $CD8^+$ T cell infiltration after anti-PD-1 therapy in tumor bearing mice, and the results were further verified by HE and immunofluorescence staining. $CD8^+$ T cell depletion study was performed to determine the role of $CD8^+$ T cells in the tumor responses to anti-PD-1 therapy. Two-way analysis of variance was used to compare the data difference. **Results** The labeling yield of $^{99}Tc^m$-αCD8/Fab was 90% with a high radiochemical purity (95%) and good stability *in vitro* (radiochemical purity still more than 80% after 720 min in PBS and FBS). $^{99}Tc^m$-αCD8/Fab could specifically bind to mouse $CD8^+$ T cells ((10.30±0.81) percent added radioactive dose (%AD)/10^6 cells), compared with the binding ability in human peripheral blood lymphocytes group and CD8 antibody blocking group ((1.78±0.61) and (1.59±0.25) %AD/10^6 cells; F=10.07, P<0.001). SPECT/CT imaging showed that $^{99}Tc^m$-αCD8/Fab had markedly higher tumor uptake in the CT26 colon cancer mouse models. Near-infrared fluorescence imaging showed that the tumor uptake of $^{99}Tc^m$-αCD8/Fab in the responsive group was significantly higher than in the nonresponsive group after anti-PD-1 treatment ((8.9±1.1)% *vs* (7.1±0.8)%; F=4.69, P=0.024), and SPECT/CT imaging found the similar result. HE and immunofluorescence staining of tumor and lymph nodes showed that the proportion of lymphocyte infiltration was higher in the responsive group. Furthermore, $CD8^+$ T cell depletion significantly reversed the therapeutic effect of anti-PD-1 immunotherapy in tumor-bearing mice. **Conclusions** In this study, $^{99}Tc^m$-αCD8/Fab was successfully obtained. CD8-specific SPECT imaging could sensitively visualize the tumor-infiltrating $CD8^+$ T cells, suggesting the potential application value to predict and evaluate the efficacy of immunotherapy in the clinical settings.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Lymphocytes, tumor-infiltrating; CD8-positive T-lymphocytes; Programmed cell death 1 receptor; Treatment outcome; Forecasting; Mice

Fund program: Beijing Natural Science Foundation (JQ19026)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20210705-00219

以抗程序性细胞死亡蛋白-1(programmed death-1, PD-1)/程序性细胞死亡蛋白配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)免疫检查点抑制剂为代表的肿瘤免疫治疗在多种类型的肿瘤治疗中取得突破性进展,但仍存在获益患者比例低、整体疗效不好等问题,其总体有效率不足 30%,这凸显了免疫治疗的复杂性[1]。肿瘤特殊的免疫微环境组成以及对免疫治疗的耐药性可明显影响治疗效果,而准确监测和评估免疫治疗疗效仍是临床面临的一大难题。与现有临床诊断和评估免疫治疗疗效的手段相比,核医学分子影像可以无创监测系统和肿瘤内免疫细胞数量和定位的变化,并可能为预测和评估临床免疫治疗反应提供可靠的诊断方法。

肿瘤浸润 $CD8^+$ T 细胞在免疫治疗中的核心作用日益明显。肿瘤微环境中 $CD8^+$ T 细胞的数量与对免疫治疗的整体响应率有关[2],并且其数量还可以预测乳腺癌、肺癌、卵巢癌、黑色素瘤和结肠直肠癌的总体生存率[3]。本研究组选取 $CD8^+$ T 细胞为靶向分子,将抗 CD8/Fab 片段经过螯合剂联肼尼克酰胺(hydrazinonicotinamide, HYNIC)修饰后,进行$^{99}Tc^m$标记,获得靶向探针$^{99}Tc^m$-αCD8/Fab,并在抗 PD-1 免疫治疗模型中评估该探针用于 SPECT/CT 显像以预测抗 PD-1 免疫治疗疗效的可行性。现报道如下。

材料与方法

1.主要实验材料与仪器。αCD8 抗体(即鼠源抗 CD8 抗体;美国 BioX cell 公司);IRDye800-*N*-羟基琥珀酰亚胺(hydroxysuccinimide, NHS;美国 LI-COR 公司);HYNIC(上海浩元生物科技有限公司);小鼠结直肠癌 CT26 细胞(上海酶研生物科技有限公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰酶、PBS(北京中科迈晨生物科技有限公司);$Na^{99}Tc^mO_4$(北京原子高科股份有限公司);AR2000 薄层色谱仪(美国 Bioscan 公司);Maestro 小动物荧光成像系统(美国 CRI 公司);SPECT/CT 仪(匈牙利 Mediso 公司)。

2.实验动物。雌性 BALB/c 小鼠 90 只,体质量 18~20 g,4~6 周龄;购自北京大学医学部实验动物部,饲养环境无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级;实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0010,伦理委员会动物实验许可批件号:SYXK(京)2016-0041。

3.荷瘤小鼠模型建立。CT26 细胞培养如文献[4]中所述。于 BALB/c 小鼠下肢接种 CT26 细胞(北京大学医学同位素中心存株)2×10^6 个,待肿瘤平均最大体积达到 100 mm^3 时用于实验。

4.放射性标记抗体制备。αCD8 抗体 Fab 片段(αCD8/Fab)的制备按说明书操作,同前期研究[5];Dye-αCD8/Fab 合成也参考该文献。$^{99}Tc^m$-αCD8/Fab 合成方法简述如下:将 20 μg HYNIC-αCD8/Fab 前体、5 mg 三(羟甲基) 甲基甘氨酸(tricine)和 20 μg $SnCl_2$ 于离心管中混匀,向混合溶液中加入 150 μl $Na^{99}Tc^mO_4$ 溶液(约 185 MBq),37 ℃下反应 40 min,获得标记产物。产物经 PD-10 脱盐柱纯化后,用薄

层色谱仪检测其放化纯。^{99}Tc^{m}-免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G/Fab 合成与放射性标记同^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab。

5. ^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 体外稳定性检测。取 100 μl ^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 溶液,分别加入等体积 PBS 和 FBS,于室温(PBS)和 37 ℃(FBS)温育 30、60、120、180、240 及 300 min,测定各时间点的放化纯[6]。

6.体外 CD8^{+} T 细胞受体结合、阻断实验。小鼠脾脏淋巴细胞和人外周血淋巴细胞提取如文献[7-8]中所述。将淋巴细胞于 6 孔培养板铺板(1×10^{6} 个细胞/孔)后加入 1.11 kBq ^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 探针,同时设置封闭组,封闭组每孔加入过量的冷 αCD8 抗体;4 ℃共温育 2 h 后用 1 ml 冷的 PBS 冲洗 3 次,500× *g* 离心 5 min 后弃上清,收集细胞转移入放免管中,测量其放射性计数;设 5 个平行孔,实验重复 2 次[9]。

7.体内靶向特异性实验[10]。取 15 只荷瘤小鼠,采用简单随机抽样法分为^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 组、对照组和封闭组,每组 5 只;分别经尾静脉注射 14.8 MBq(100 μl)^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab、14.8 MBq(100 μl)^{99}Tc^{m}-IgG/Fab、500 μg αCD8 抗体+14.8 MBq(100 μl) ^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab,于注射后 6 h(实验室前期工作提示,抗体 Fab 片段制备的分子探针在荷瘤小鼠最佳显像时间约为 6 h[11])行 SPECT/CT 显像,数据经重建后得到融合图像。

8.抗 PD-1 免疫治疗实验。将 25 只荷瘤小鼠采用简单随机抽样法分为对照组(5 只)、抗 PD-1 组(20 只);对抗 PD-1 组于 1、3、5、7 d 尾静脉给予抗 PD-1 抗体(αPD-1) 150 μg,对照组给予生理盐水 100 μl。参考文献[12],根据治疗后第 8 天按肿瘤相对体积变化(第 8 天肿瘤体积/第 0 天肿瘤体积)将抗 PD-1 组分为响应组和非响应组(相对体积比为 1~2 的归入响应组),计算治疗响应率(响应组小鼠数量/小鼠总数量×100%),并进行近红外荧光成像和 SPECT/CT 显像。荧光成像:予响应组、非响应组、对照组荷瘤小鼠尾静脉注射 100 μl Dye-αCD8/Fab(30 nmol/L),注射后 6 h 使用 Maestro 小动物荧光成像系统进行成像,并用 Maestro 2.0 软件进行定量处理。荧光成像完成后第 2 天对响应组、非响应组荷瘤小鼠行 SPECT/CT 显像:经小鼠尾静脉注射 14.8 MBq(100 μl)^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab,用体积分数 3%异氟烷麻醉小鼠,于注射显像剂后 4、6 和 12 h 进行显像,数据经重建后得到融合图像。显像完成后进行肿瘤组织 HE 染色、肿瘤和淋巴结 CD8^{+} T 细胞免疫荧光染色,实验操作同前期工作[5,11]。

9. CD8^{+} T 细胞耗损实验。取 50 只荷瘤小鼠,采用简单随机抽样法分为对照组(5 只)、抗 PD-1 组(45 只);对抗 PD-1 组 45 只小鼠于 1、3、5、7、9、11 d 尾静脉给予 αPD-1 150 μg,于第 7 天按肿瘤相对体积变化将其分为响应组和非响应组。随后将响应组小鼠分为抗 PD-1 响应组和抗 PD-1 响应+αCD8 组,对后一组于 7、9、11 d 经尾静脉给予 αCD8 抗体 300 μg。所有实验小鼠均每隔 1 天监测肿瘤体积大小(V=长×宽×宽/2)。于 13 d 结束观察,进行肿瘤组织免疫荧光染色(肿瘤细胞增殖核抗原 Ki-67 染色),方法同前。

10.统计学处理。采用 Prism 8.0 软件进行数据分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用双因素方差分析比较组间差异,P<0.05 为差异有统计学意义。

结　　果

1. ^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 体外稳定性评价。^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 探针的标记率为 90%,放化纯为 95%,在 PBS 和 FBS 中放置 720 min 放化纯仍保持 80%以上,稳定性良好。

2.体外 CD8^{+} T 细胞受体结合、阻断实验。^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 探针与小鼠脾 CD8^{+} T 细胞受体结合值为(10.30±0.81)百分加入放射性剂量(percent added radioactive dose, %AD)/10^{6} 个细胞,而探针与人外周血 CD8^{+} T 细胞受体结合值仅为(1.78±0.61) %AD/10^{6} 个细胞;过量的冷 αCD8 抗体可导致探针与小鼠脾 CD8^{+} T 细胞受体结合值降低至(1.59±0.25) %AD/10^{6} 个细胞(F=10.07,P<0.001)。

3.体内特异性结合实验。SPECT/CT 显像结果示,在给药后 6 h,^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 在荷瘤小鼠肿瘤组织有明显摄取,且小鼠脾及淋巴结有一定摄取(图 1A),而对照组肿瘤未见明显摄取(图 1B),过量 αCD8 冷抗体共注射可明显降低肿瘤对探针的摄取(图 1C)。

4.抗 PD-1 免疫治疗实验。(1)抗 PD-1 组 20 只荷瘤小鼠中,4 只小鼠第 8 天肿瘤相对体积被明显抑制(F=11.93, P<0.001),荷瘤小鼠对抗 PD-1 免疫治疗的响应率为 20%(4/20);对照组肿瘤持续增长(图 2)。

(2)近红外成像图见图 3A。在注射 Dye-αCD8/Fab 后 6 h,抗 PD-1 响应组荷瘤小鼠肿瘤荧光强度为(8.9±1.1)%,高于非响应组的(7.1±0.8)%,对照组相应值为 (7.3±0.5)%(F=4.69,P=0.024);各组肿瘤/肌肉荧光强度比依次为 2.9±0.2、2.1±0.1 和 2.0±0.1,差异有统计学意义(F=6.44,P<0.001)。

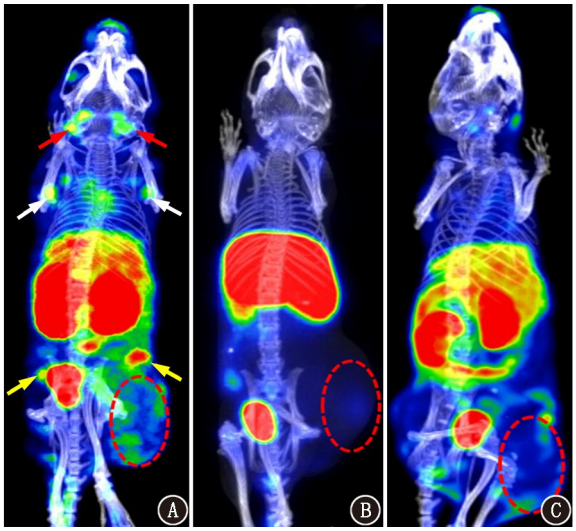

图 1 3 组小鼠结直肠癌 CT26 细胞荷瘤小鼠 SPECT/CT 显像图(红箭头示颈部淋巴结,白箭头示腋下淋巴结,黄箭头示腹股沟淋巴结,红色虚线圈示肿瘤部位)。A. ^{99}Tc^{m}-联肼尼克酰胺(HYNIC)-αCD8/Fab(^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab)组小鼠肿瘤显像剂摄取明显,脾及淋巴结有一定摄取;B. ^{99}Tc^{m}-免疫球蛋白(Ig)G/Fab 对照组肿瘤部位未见明显显像剂摄取;C.过量抗 CD8 冷抗体共注射阻断组肿瘤摄取明显降低

SPECT/CT 显像结果证实,响应组肿瘤对^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 探针的摄取高于非响应组;探针注射后 4 h,肿瘤部位即显影,随后肿瘤摄取持续增加,6 h 时肿瘤显影清晰, 12 h 仍有明显显影,且探针在脾脏及淋巴结也有较高摄取(3B)。HE 染色和免疫荧光检测结果显示,相比于非响应组,响应组肿瘤和淋巴结组织有明显 T 淋巴细胞浸润(图 4)。

5. CD8^{+} T 细胞耗损实验。45 只抗 PD-1 组中,响应组 10 只,非响应组 35 只。响应组 10 只小鼠中,抗 PD-1 响应组和抗 PD-1 响应+ αCD8 组各 5 只。经 CD8^{+} T 细胞损耗后,抗 PD-1 免疫治疗疗效明显降低(图 5A)。Ki-67 增殖免疫荧光检测同样发现,CD8^{+} T 细胞损耗显著增加了肿瘤细胞增殖(图 5B)。对照组与抗 PD-1 非响应组、响应组的 Ki-67 阳性细胞百分比分别为(19.9±3.5)%、(15.1±2.0)%、(3.4±1.4)%,差异有统计学意义(F=2.06, P<0.001)。

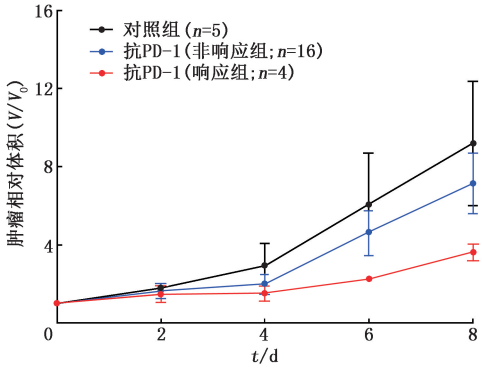

图 2 3 组小鼠结直肠癌 CT26 细胞荷瘤小鼠经相应处理后肿瘤体积变化曲线。可见处理后第 8 天响应组肿瘤相对体积变化明显大于非响应组。PD-1 为程序性细胞死亡蛋白-1

讨 论

准确监测和评估免疫治疗疗效仍是临床面临的一大难题。由于肿瘤内部和周围免疫微环境的复杂性,很难找到广泛的生物标志物,而 CD8^{+} T 淋巴细胞,特别是肿瘤浸润 CD8^{+} T 淋巴细胞在抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用。有研究者运用^{89}Zr 和^{64}Cu 分别标记抗 CD8 双特异抗体(diabody)和微抗体(minibody)并进行PET显像,成功评估了免疫治疗

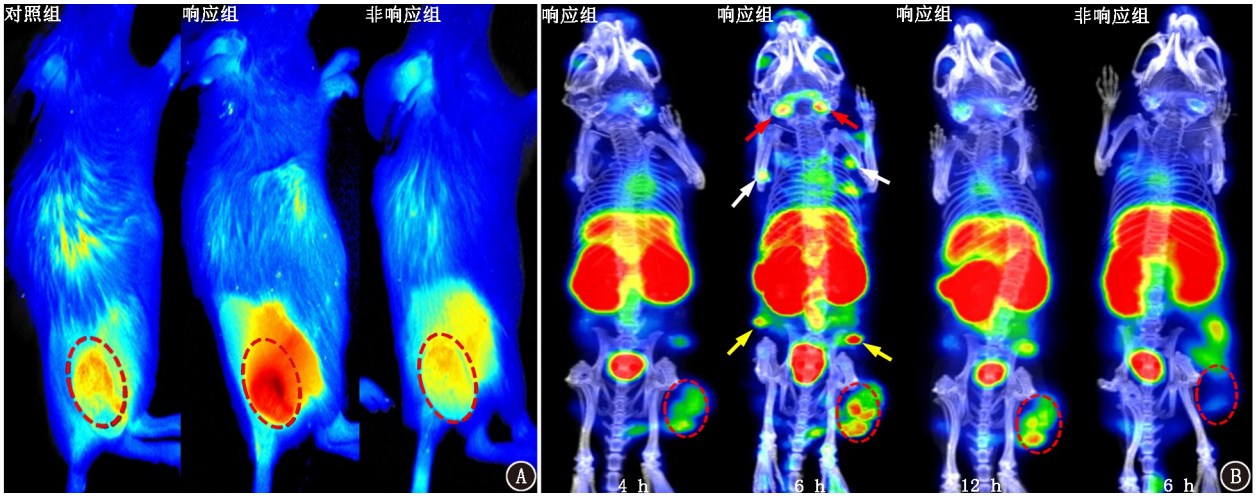

图 3 不同组小鼠结直肠癌 CT26 细胞荷瘤小鼠影像学检查图(红箭头示颈部淋巴结,白箭头示腋下淋巴结,黄箭头示腹股沟淋巴结,红色虚线圈示肿瘤部位)。A.抗 PD-1 响应组、非响应组及生理盐水对照组近红外成像图,注射 Dye-αCD8/Fab 后 6 h,响应组荧光强度最高;B. SPECT/CT 显像示,注射^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 后 4 h,响应组肿瘤即显影,注射后 6 h,非响应组肿瘤摄取不明显

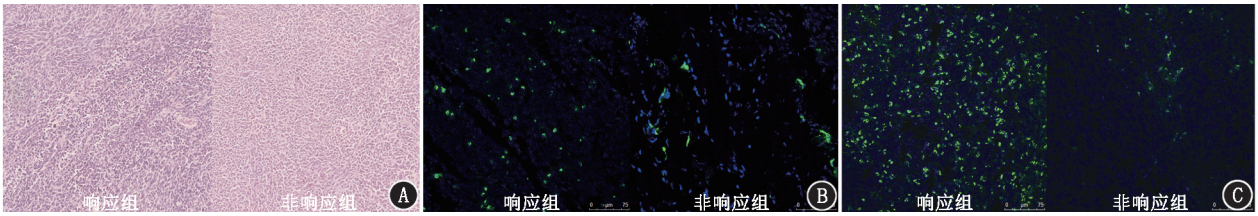

图 4　抗程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)响应组和非响应组小鼠结直肠癌 CT26 细胞荷瘤小鼠组织染色图(× 40)。A.肿瘤组织 HE 染色图;B.肿瘤组织 $CD8^+$ T 细胞免疫荧光染色图;C.淋巴结组织 $CD8^+$ T 细胞免疫荧光染色图。可见响应组肿瘤和淋巴结组织有明显 T 淋巴细胞浸润

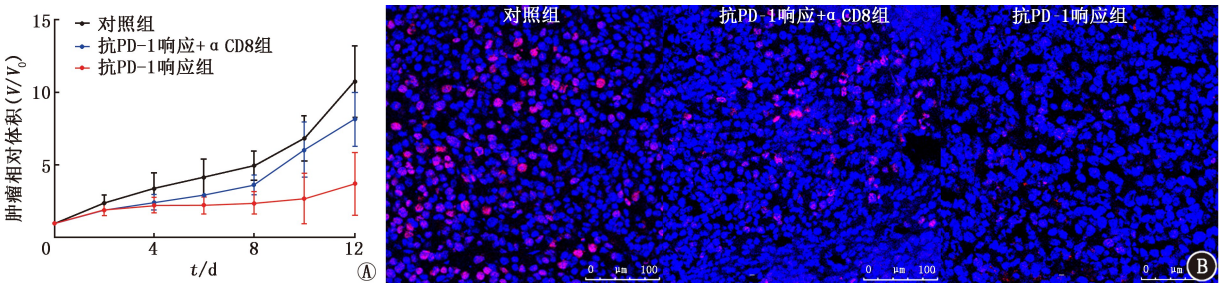

图 5　$CD8^+$ T 细胞耗损实验 3 组小鼠结直肠癌 CT26 细胞荷瘤小鼠的肿瘤体积变化及免疫荧光染色结果。A.对照组与抗 PD-1 响应+αCD8 组、抗 PD-1 响应组(各组 5 只荷瘤小鼠)肿瘤相对体积变化;B.各组肿瘤细胞增殖核抗原 Ki-67 免疫荧光染色图,可见 $CD8^+$ T 细胞损耗显著增加了肿瘤细胞增殖,图中蓝色为 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色的细胞核 ,红色为 Ki-67 阳性细胞

中肿瘤浸润 $CD8^+$ T 细胞变化[13-14]。Griessinger 等[15]的研究示,^{89}Zr 标记的人特异性 CD8 微抗体^{89}Zr-Df-IAB22M2C 能特异地对免疫治疗后肿瘤浸润 $CD8^+$ T 细胞以及淋巴结 $CD8^+$ T 细胞的活化状态显像,而且抗 CD8 微抗体的药代动力学有利于 PET 显像,并克服了全长抗体如 CD3、CD4、CD25 或 CD45 等 T 细胞表位显像的局限性[16]。本研究成功制备了放化纯高和稳定性良好的^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab,后续实验发现,^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 能有效靶向 $CD8^+$ T 细胞组织,SPECT/CT 显像示,注射^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 后 6 h CT26 荷瘤小鼠肿瘤组织有明显显像剂摄取;近红外荧光成像及 SPECT/CT 显像显示,对抗 PD-1 免疫治疗响应组小鼠肿瘤摄取较高,HE 和免疫荧光染色证实响应组肿瘤组织中淋巴细胞浸润比例高于非响应组,而 $CD8^+$ T 细胞损耗显著削弱了抗 PD-1 治疗疗效,这些结果表明^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab 能预测抗 PD-1 免疫治疗的响应性;另外,此探针还能靶向淋巴结和脾脏中 $CD8^+$ T 细胞,提示抗 PD-1 免疫疗法一方面可以蓄积肿瘤内浸润 T 淋巴细胞起杀伤作用,另一方面能调动全身效应 T 淋巴细胞增加其抗肿瘤作用。

肿瘤免疫微环境中存在许多免疫细胞亚群,虽然多种免疫细胞表型,包括 CD3、CD4、CD8 和 CD20 等的显像已被证实能够准确量化免疫细胞类型及其体内分布[13,17],但大多数情况下,这些显像途径无法预测早期免疫治疗反应。对于早期预测免疫反应疗效,免疫细胞活化的生物标志物是必不可少的,T 细胞共刺激受体 CD278 即其中之一。研究表明,^{89}Zr-去铁敏-诱导性 T 细胞共刺激分子(defetoxamine-inducible T-cell costimulator, DFO-ICOS)显像能无创量化激活的 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞,用于监测免疫治疗反应下 T 细胞活化[18]。本课题组最近也报道了肿瘤细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)靶向显像可检测 $CD8^+$ T 细胞活化,预测肿瘤放疗引发的远隔效应(abscopal effect)[11]。因此,在后续的研究中,有必要深入探讨细胞毒性 T 细胞激活后相关生物标志物的核医学显像方法,为免疫治疗疗效的早期预测提供有效手段。

需指出的是,由于肿瘤微环境的复杂性,对单一的生物标志物显像可能不足以反映免疫治疗的时效性,后续可针对多靶点进行联合显像,为免疫治疗疗效的预测提供更可靠的方法。总之,本研究制备了 $CD8^+$ T 细胞特异性 SPECT 显像探针^{99}Tc^{m}-αCD8/Fab,并采用该探针成功监测了肿瘤浸润 $CD8^+$ T 细胞的动态变化,可以开展进一步的研究。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　黎奎:实验设计、研究实施、数据分析、论文撰写;高立权、杨秀杰、宋瑞:研究实施、数据采集;赵慧云:论文修改、材料支持;刘昭飞:论文修改、经费支持

参　考　文　献

[1] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a

common denominator approach to cancer therapy[J]. Cancer Cell, 2015, 27(4): 450-461. DOI:10.1016/j.ccell.2015.03.001.

[2] Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored[J]. Oncogene, 2010, 29(8): 1093-1102. DOI: 10.1038/onc.2009.416.

[3] Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2011, 105(1): 93-103. DOI:10.1038/bjc.2011.189.

[4] 张颖颖,石岱,徐展,等.靶向 CD11b 受体^{68}Ga 生物正交点击化学预定位分子探针的制备及结肠癌模型鼠显像[J].中华核医学与分子影像杂志, 2021, 41(10): 585-591. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20210701-00218.
Zhang YY, Shi D, Xu Z, et al. Preparation of ^{68}Ga labeled pretargeted molecular probe based on bio-orthogonal Diels-Alder click chemistry and CD11b receptor targeted imaging in CT26 colon cancer mouse models[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2021, 41(10): 585-591. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20210701-00218.

[5] Zhao Y, Zhang C, Gao L, et al. Chemotherapy-induced macrophage infiltration into tumors enhances nanographene-based photodynamic therapy[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 6021-6032. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-1655.

[6] Lu D, Wang Y, Zhang T, et al. Metabolic radiolabeling and *in vivo* PET imaging of cytotoxic T lymphocytes to guide combination adoptive cell transfer cancer therapy[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 175. DOI:10.1186/s12951-021-00924-2.

[7] 李明利,边宝林,王宏洁,等.玛咖不同提取物和单体对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生 IL-2 和 TNF-α 的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 97-103. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212304.
Li ML, Bian BL, Wang HJ, et al. Effects of different extracts and monomers of Lepidium meyenii (Maca) on the proliferation of mouse splenic lymphocytes and the induction of IL-2 and TNF-α [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(23): 97-103. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212304.

[8] 李卫霞,刘晓霞,陈剑华,等. PM2.5 抑制 PHA 诱导的人外周血 T 细胞转化作用[J].现代免疫学, 2021, 41(5): 397-401.
Li WX, Liu XX, Chen JH, et al. The inhibitory effect of PM2.5 on the transformation of human peripheral blood T cells induced by PHA[J]. Current Imunol, 2021, 41(5): 397-401.

[9] 李立强,董诚岩,杨志,等.肿瘤阳离子显像剂^{111}In-TPP 类似物的制备与生物学评价[J].中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(1): 20-24. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.01.006.
Li LQ, Dong CY, Yang Z, et al. Preparation and biological evaluation of ^{111}In-triphenylphosphonium cations[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(1): 20-24. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.01.006.

[10] Feng X, Wang Y, Lu D, et al. Clinical translation of a ^{68}Ga-labeled integrin $\alpha_v\beta_6$-targeting cyclic radiotracer for PET imaging of pancreatic cancer[J]. J Nucl Med, 2020, 61(10): 1461-1467. DOI:10.2967/jnumed.119.237347.

[11] Zhao Y, Zhang T, Wang Y, et al. ICAM-1 orchestrates the abscopal effect of tumor radiotherapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(14): e2010333118. DOI:10.1073/pnas.2010333118.

[12] Rashidian M, LaFleur MW, Ploegh HL, et al. Immuno-PET identifies the myeloid compartment as a key contributor to the outcome of the antitumor response under PD-1 blockade[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(34): 16971-16980. DOI:10.1073/pnas.1905005116.

[13] Seo JW, Tavaré R, Mahakian LM, et al. CD8$^+$ T-cell density imaging with ^{64}Cu-labeled Cys-diabody informs immunotherapy protocols[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(20): 4976-4987. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-0261.

[14] Tavaré R, Escuin-Ordinas H, Mok S, et al. An effective immuno-PET imaging method to monitor CD8-dependent responses to immunotherapy[J]. Cancer Res, 2016, 76(1): 73-82. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1707.

[15] Griessinger CM, Olafsen T, Mascioni A, et al. The PET-tracer ^{89}Zr-Df-IAB22M2C enables monitoring of intratumoral CD8 T-cell infiltrates in tumor-bearing humanized mice after T-cell bispecific antibody treatment[J]. Cancer Res, 2020, 80(13): 2903-2913. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-19-3269.

[16] Malviya G, Galli F, Sonni I, et al. Imaging T-lymphocytes in inflammatory diseases: a nuclear medicine approach[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 58(3): 237-257.

[17] Freise AC, Zettlitz KA, Salazar FB, et al. ImmunoPET imaging of murine CD4$^+$ T cells using anti-CD4 cys-diabody: effects of protein dose on T cell function and imaging[J]. Mol Imaging Biol, 2017, 19(4): 599-609. DOI:10.1007/s11307-016-1032-z.

[18] Xiao Z, Mayer AT, Nobashi TW, et al. ICOS is an indicator of T-cell-mediated response to cancer immunotherapy[J]. Cancer Res, 2020, 80(14): 3023-3032. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3265.

(收稿日期:2021-07-05)