

化疗联合 PD-1 抑制剂一线治疗 Lewis 肺癌移植瘤的疗效及其调控机体细胞免疫功能的机制

何方¹ 高艳¹ 齐海燕¹ 李焱² 许崇安¹

¹中国医科大学附属第四医院肿瘤内科,沈阳 110032; ²中国医科大学附属第四医院转化医学中心,沈阳 110032

通信作者:许崇安,Email: cmu4th-xca@126.com

【摘要】 目的 探讨化疗联合程序性死亡蛋白-1 (PD-1) 抑制剂一线治疗 Lewis 肺癌移植瘤的疗效及其对机体细胞免疫功能调控的可能机制。方法 建立小鼠 Lewis 肺癌移植瘤小鼠模型,成瘤小鼠采用随机数字表法随机分为对照组、化疗组、免疫治疗组和联合治疗组(每组 10 只),分别给予生理盐水、顺铂、PD-1 抑制剂和顺铂 + PD-1 抑制剂,观察各组小鼠肿瘤生长情况及生存期。流式细胞仪检测并比较各组 CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 的比例。结果 治疗结束后第 2 天,对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠肿瘤体积分别为(1 662.0 ± 209.0)mm³、(1 189.2 ± 155.6)mm³、(991.1 ± 146.6)mm³、(761.7 ± 141.8)mm³,4 组间差异具有统计学意义($F=29.78, P<0.001$);3 个治疗组小鼠的肿瘤体积显著小于对照组,联合治疗组显著小于化疗组和免疫治疗组,免疫治疗组显著小于化疗组(均 $P<0.05$)。实验期间共有 3 只小鼠死亡(对照组 2 只,化疗组 1 只)。4 组小鼠的中位生存期分别为 10、12、14、18 d,组间差异具有统计学意义($\chi^2=26.06, P<0.001$);3 个治疗组小鼠的中位生存时间长于对照组,联合治疗组显著长于化疗组和免疫治疗组,免疫治疗组显著长于化疗组(均 $P<0.05$)。4 组小鼠的外周血中 CD8⁺T 细胞比例分别为(28.5 ± 1.2)%、(33.9 ± 2.9)%、(34.0 ± 2.5)%、(42.4 ± 1.5)%,组间差异具有统计学意义($F=21.32, P<0.001$);3 个治疗组外周血 CD8⁺T 细胞比例显著高于对照组,联合治疗组显著高于化疗组和免疫治疗组(均 $P<0.05$)。4 组小鼠的肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞比例分别为(23.5 ± 1.3)%、(26.7 ± 1.4)%、(34.2 ± 2.8)%、(41.3 ± 2.0)%,组间差异具有统计学意义($F=61.65, P<0.001$);3 个治疗组肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞比例高于对照组,联合治疗组显著高于化疗组和免疫治疗组,免疫治疗组显著高于化疗组(均 $P<0.05$)。4 组小鼠的脾组织中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞比例分别为(8.6 ± 0.5)%、(7.2 ± 0.3)%、(6.3 ± 0.4)%、(5.4 ± 0.4)%,组间差异具有统计学意义($F=37.06, P<0.001$);3 个治疗组脾组织中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞比例显著低于对照组,联合治疗组显著低于化疗组和免疫治疗组,免疫治疗组显著低于化疗组(均 $P<0.05$)。结论 化疗、PD-1 抑制剂可通过下调 Treg 细胞比例、上调 CD8⁺T 细胞比例等增强机体免疫细胞功能的途径提高机体免疫系统的抗肿瘤作用,化疗联合免疫治疗无论在提高机体抗肿瘤免疫功能方面,还是在抑制肿瘤生长及延长移植瘤小鼠生存期方面均显著优于单纯化疗和免疫治疗。

【关键词】 肺肿瘤; 药物疗法; 免疫疗法; T 淋巴细胞亚群; PD-1

基金项目:沈阳市科技计划(F14-158-9-32);中国医科大学附属第四医院院长基金(M001)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.08.002

Therapeutic effect and mechanism of regulating cellular immune function of chemotherapy combined with PD-1 inhibitor in the first-line treatment of Lewis xenografts

He Fang¹, Gao Yan¹, Qi Haiyan¹, Li Qin², Xu Chong'an¹

¹Department of Oncology Medicine, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China; ²Center for Translational Medicine, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

Corresponding author: Xu Chong'an, Email: cmu4th-xca@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of chemotherapy combined with programmed death-1 (PD-1) inhibitor in the first-line treatment of Lewis xenografts and its possible mechanism of regulating cellular immune function. **Methods** Lewis xenografts mouse model was established. The mice were randomly divided into control, chemotherapy, immunotherapy and combination group according to the method of random number table (10 in each group), and each group separately received saline, cisplatin, PD-1 inhibitor and cisplatin combined with PD-1 inhibitor. The tumor growth and survival of each group were observed. Flow cytometry was used to detect and compare the proportion of CD8⁺ T cells and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells (Treg cells). **Results** On the second day after treatment, the tumor volume of Lewis xenografts in control group, chemotherapy group, immunotherapy group and combination group were (1 662.0 ± 209.0) mm³, (1 189.2 ± 155.6) mm³, (991.1 ± 146.6) mm³ and (761.7 ± 141.8) mm³, with statistically significant difference ($F = 29.78, P < 0.001$). The tumor volume in the three treatment groups were significantly smaller than that in control group, combination group was significantly smaller than chemotherapy group and immunotherapy group, and immunotherapy group was significantly smaller than chemotherapy group (all $P < 0.05$). Three mice died during the experiment (two in control group and one in chemotherapy group). The median survival time of mice in the four groups were 10, 12, 14 and 18 days, with statistically significant difference ($\chi^2 = 26.06, P < 0.001$). The median survival time of mice in the three treatment groups were significantly longer than that in control group, combination group was significantly longer than chemotherapy group and immunotherapy group, and immunotherapy group was significantly longer than chemotherapy group (all $P < 0.05$). The proportions of CD8⁺ T cells in the peripheral blood of the four groups were (28.5 ± 1.2)%, (33.9 ± 2.9)%, (34.0 ± 2.5)% and (42.4 ± 1.5)%, with statistically significant difference ($F = 21.32, P < 0.001$). The proportions of CD8⁺ T cells in the peripheral blood of the three treatment groups were significantly higher than that of control group, and combination group was significantly higher than chemotherapy group and immunotherapy group (all $P < 0.05$). The proportions of CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment of the four groups were (23.5 ± 1.3)%, (26.7 ± 1.4)%, (34.2 ± 2.8)% and (41.3 ± 2.0)%, with statistically significant difference ($F = 61.65, P < 0.001$). The proportions of CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment of the three treatment groups were significantly higher than that of control group, combination group was significantly higher than chemotherapy group and immunotherapy group, and immunotherapy group was significantly higher than chemotherapy group (all $P < 0.05$). The proportions of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg cells in the spleen of the four groups were (8.6 ± 0.5)%, (7.2 ± 0.3)%, (6.3 ± 0.4)% and (5.4 ± 0.4)%, with statistically significant difference ($F = 37.06, P < 0.001$). The proportions of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg cells in the spleen of the three treatment groups were significantly lower than that of control group, combination group was significantly lower than chemotherapy group and immunotherapy group, and immunotherapy group was significantly lower than chemotherapy group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Chemotherapy and PD-1 inhibitor can enhance the anti-tumor effect of the body immune system by down-regulating the proportion of Treg cells and up-regulating the proportion of CD8⁺ T cells, etc. Chemotherapy combined with immunotherapy can improve the anti-tumor immune function, inhibit tumor growth and prolong the survival of mouse with xenograft, which were significantly better than chemotherapy and immunotherapy alone.

【Key words】 Lung neoplasms; Drug therapy; Immunotherapy; T-lymphocyte subsets; PD-1

Fund program: Science and Technology Program of Shenyang of China (F14-158-9-32); Presidential Fund of Fourth Affiliated Hospital of China Medical University (M001)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.08.002

以程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 及程序性死亡蛋白配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 抑制剂为代表的免疫治疗在晚期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 一、二线治疗中取得了令人瞩目的成果^[1-2], 高表达人群 (>50%) 接受 PD-1 抑制剂 pembrolizumab 单药一线治疗的有效率为 45.5%^[3], 最新研究证实对于 PD-L1

低表达 NSCLC 患者, 一线 pembrolizumab 治疗的疗效仍优于化疗^[4]。化疗可通过多种途径不同程度地诱发和 (或) 增强机体抗肿瘤免疫反应, 并可上调 PD-L1 的表达^[5], 进而增强 PD-1/PD-L1 抑制剂的抗肿瘤作用。因此, 化疗联合 PD-1/PD-L1 抑制剂可能具有协同增效作用, 二者联用有望显著提高 NSCLC 的疗效。最新的临床研究显示化疗联合 pembrolizumab 一线治

疗晚期 NSCLC 给患者带来显著的临床获益^[6],但其对机体细胞免疫功能调控的机制尚未十分清楚。本研究旨在探讨化疗联合 PD-1 抑制剂一线治疗小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的疗效及其对机体细胞免疫功能调控的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、实验小鼠及试剂

小鼠 Lewis 肺癌细胞株购于中国科学院上海细胞库。C57BL/6 小鼠(雌性,6~8 周龄,重 18~20 g)购于北京维通利华技术有限公司,饲养于无特定病原体级环境。实验动物许可证编号:SCXK(京)2016-0006,动物实验人员资格证书编号:IACUC 201716013。实验获中国医科大学实验动物伦理委员会批准(批号:2017081)。

顺铂(批号:H20023461)购自山东齐鲁制药有限公司;PD-1 抑制剂-抗鼠 PD-1 单克隆抗体购于美国 BioXcell 公司;CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)检测试剂盒、红细胞裂解液购于美国 eBioscience 公司;IV 型胶原酶购于美国 Worthington 公司;0.25% 胰蛋白酶购于中国天津灏洋生物有限公司,DMEM 高糖购于美国 Hyclone 公司。采用美国 Becton Dickinson 公司 FACS Accuri C6 流式细胞仪和配套的淋巴细胞亚群检测试剂盒进行检测。

1.2 细胞培养及 Lewis 肺癌移植瘤小鼠模型的构建

Lewis 肺癌细胞培养于 DMEM/高糖培养基中(10% 胎牛血清,100 μg/ml 青霉素-链霉素),于 37 °C、5% CO₂、90% 湿度孵箱中培养,细胞贴壁。取对数生长期细胞,消化计数,约 1 × 10⁶ 个细胞/只接种于 C57BL/6 小鼠背部。

1.3 不同治疗组小鼠肿瘤体积和中位生存期的比较

选取移植瘤体积生长至 62.5 mm³~100 mm³ 的小鼠进行实验。40 只移植瘤小鼠采用随机数字表法随机分为对照组(生理盐水)、化疗组(顺铂)、免疫治疗组(PD-1 抑制剂)和联合治疗组(顺铂+PD-1 抑制剂),具体用药:生理盐水,0.2 ml/只;顺铂,5 mg/kg,给药 1 次;PD-1 抑制剂,200 μg/只,每 3 天给药 1 次,共给药 3 次,各组用药均采用腹腔内注射给药方式。每组 10 只小鼠,5 只用于观察肿瘤生长情况和生存期,5 只用于 T 细胞亚群的检测。肿瘤体积(V) = a × b²/2(a 为最大长径,b 为最小短径)。荷瘤小鼠的生存时间定义为从随机分组至小鼠死亡或肿瘤体积 > 2 000 mm³ 或体重减轻 > 15% 的时间^[7-8],并绘制生存曲线。

1.4 淋巴细胞亚群的检测

1.4.1 CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ T 细胞的检测:治

疗结束后第 3 天,采用眼眶静脉丛采血法采取新鲜抗凝全血 100~150 μl 后,采用颈椎脱臼法处死小鼠,无菌剥离、摘取完整脾脏和肿瘤组织。研磨、过滤脾组织,室温 300 × g 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬洗涤,加入 PBS 调至细胞终浓度为 1 × 10⁶~1 × 10⁸ 个/ml 的脾组织单细胞悬液备用。洗涤摘取肿瘤组织,并剪成 1~2 mm 大小碎块,加入 IV 型胶原酶于 37 °C 水浴箱中避光消化 1 h、过滤、室温 300 × g 离心 5 min、PBS 重悬洗涤 2 次,加入 PBS 调至细胞终浓度为 1 × 10⁶~1 × 10⁸ 个/ml 的单细胞悬液备用。分别向外周抗凝血、脾组织和肿瘤组织单细胞悬液(各 50 μl)中加入 CD3-APC 2.5 μl、CD4-FITC 0.5 μl、CD8-PE 1.25 μl,4 °C 避光孵育 30 min 后加入红细胞裂解液 1 ml 裂解,避光孵育 10 min、500 × g 离心 5 min、弃上清,PBS 重悬上机检测。

1.4.2 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg 细胞的检测:按照 Treg 检测试剂盒说明书步骤进行(固定/破膜法)。取脾组织单细胞悬液 100 μl,加入 CD4-FITC 0.5 μl、CD25-APC 0.625 μl,混匀,4 °C 避光孵育 30 min,室温 500 × g 离心 5 min 后,加入 FOXP3-PE 5 μl,室温避光孵育 30 min,破膜缓冲液洗涤 2 次,室温 500 × g 离心 5 min,加入 PBS 重悬,上机检测 Treg 细胞比例。

1.5 统计学方法

采用 Prism graphpad 6.0 统计软件进行数据分析。定量资料呈正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,生存期的比较采用 log-rank 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

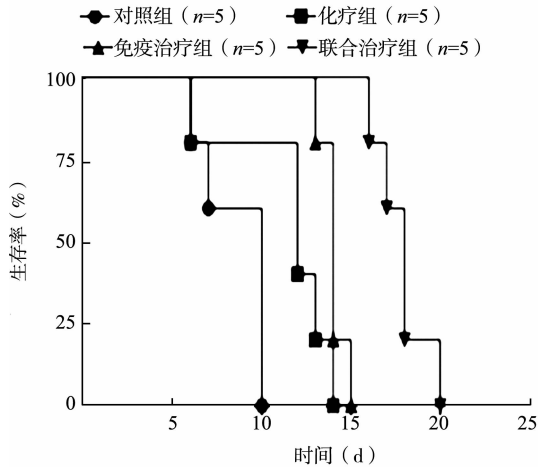
2.1 Lewis 肺癌移植瘤小鼠肿瘤体积变化

治疗结束后第 2 天,对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠肿瘤体积分别为(1 662.0 ± 209.0) mm³、(1 189.2 ± 155.6) mm³、(991.1 ± 146.6) mm³、(761.7 ± 141.8) mm³,4 组间差异具有统计学意义($F = 29.78, P < 0.001$),3 个治疗组小鼠的肿瘤体积显著小于对照组($t = 4.31, P = 0.002$; $t = 6.26, P < 0.001$; $t = 8.51, P < 0.001$),联合治疗组显著小于化疗组($t = 4.97, P < 0.001$)和免疫治疗组($t = 2.76, P = 0.023$),免疫治疗组显著小于化疗组($t = 2.27, P = 0.047$)。

2.2 不同组别小鼠的中位生存期

实验期间共有 3 只小鼠死亡(对照组 2 只,化疗组 1 只)。对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的中位生存期分别为 10、12、

14、18 d, 4 组间差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 26.06, P < 0.001$), 3 个治疗组小鼠的中位生存时间长于对照组 ($\chi^2 = 4.14, P = 0.042; \chi^2 = 8.60, P = 0.003; \chi^2 = 8.60, P = 0.003$); 联合治疗组显著长于化疗组 ($\chi^2 = 9.73, P = 0.002$) 和免疫治疗组 ($\chi^2 = 9.53, P = 0.002$), 免疫治疗组显著长于化疗组 ($\chi^2 = 4.24, P = 0.039$), 差异均具有统计学意义。见图 1。



注: 对照组采用生理盐水; 化疗组采用顺铂; 免疫治疗组采用 PD-1 抑制剂; 联合治疗组采用顺铂 + PD-1 抑制剂; PD-1 为程序性死亡蛋白-1

图 1 不同治疗方式 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的生存曲线图

2.3 不同组别 CD4⁺T 细胞

2.3.1 外周血 CD4⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的外周血中 CD4⁺T 细胞比例分别为 (68.1 ± 2.3)%、(61.3 ± 4.2)%、(60.6 ± 3.4)%、(52.3 ± 1.0)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 14.13, P = 0.002$), 免疫治疗组和联合治疗组外周血中 CD4⁺T 细胞比例低于对照组 ($t = 3.18, P = 0.034; t = 10.90, P < 0.001$), 化疗组和对照组差异无统计学意义 ($t = 2.42, P = 0.072$); 联合治疗组低于化疗组 ($t = 3.60, P = 0.023$) 和免疫治疗组 ($t = 4.13, P = 0.015$); 化疗组与免疫治疗组相似 ($t = 0.22, P = 0.834$)。见图 2A。

2.3.2 脾组织中 CD4⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的脾组织中 CD4⁺T 细胞比例分别为 (60.6 ± 1.5)%、(57.4 ± 1.7)%、(54.2 ± 2.4)%、(48.3 ± 2.6)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 18.73, P = 0.001$), 免疫治疗组和联合治疗组脾组织中 CD4⁺T 细胞比例低于对照组 ($t = 3.95, P = 0.017; t = 7.06, P = 0.002$), 化疗组和对照组差异无统计学意义 ($t = 2.47, P = 0.069$); 联合治疗组低于化疗组 ($t = 5.06,$

$P = 0.007$) 和免疫治疗组 ($t = 2.88, P = 0.045$); 化疗组与免疫治疗组相似 ($t = 1.90, P = 0.130$)。见图 2B。

2.3.3 肿瘤微环境中 CD4⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的肿瘤微环境中 CD4⁺T 细胞比例分别为 (50.0 ± 10.3)%、(42.6 ± 1.1)%、(35.6 ± 1.8)%、(40.4 ± 2.2)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 5.63, P = 0.023$), 免疫治疗组肿瘤微环境中 CD4⁺T 细胞比例低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t = 2.89, P = 0.045$), 化疗组、联合治疗组和对照组差异均无统计学意义 ($t = 1.74, P = 0.156; t = 2.08, P = 0.106$); 联合治疗组高于免疫治疗组 ($t = 2.89, P = 0.045$), 与化疗组相似 ($t = 1.59, P = 0.188$); 免疫治疗组低于化疗组 ($t = 5.77, P = 0.005$)。见图 2C。

2.4 不同组别 CD8⁺T 细胞

2.4.1 外周血 CD8⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的外周血中 CD8⁺T 细胞比例分别为 (28.5 ± 1.2)%、(33.9 ± 2.9)%、(34.0 ± 2.5)%、(42.4 ± 1.5)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 21.32, P < 0.001$), 3 个治疗组外周血 CD8⁺T 细胞比例高于对照组 ($t = 2.94, P = 0.042; t = 3.46, P = 0.026; t = 12.12, P < 0.001$); 联合治疗组显著高于化疗组 ($t = 4.47, P = 0.011$) 和免疫治疗组 ($t = 4.99, P = 0.008$); 免疫治疗组与化疗组相似 ($t = 0.06, P = 0.955$)。见图 2A。

2.4.2 脾组织中 CD8⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的脾组织中 CD8⁺T 细胞比例分别为 (30.0 ± 1.2)%、(33.8 ± 1.1)%、(34.0 ± 2.0)%、(40.0 ± 1.2)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 24.52, P < 0.001$), 3 个治疗组脾组织中 CD8⁺T 细胞比例高于对照组, 差异均具有统计学意义 ($t = 4.00, P = 0.016; t = 2.88, P = 0.045; t = 10.20, P < 0.001$); 联合治疗组显著高于化疗组 ($t = 6.58, P = 0.003$) 和免疫治疗组 ($t = 4.37, P = 0.012$); 免疫治疗组与化疗组相似 ($t = 0.15, P = 0.889$)。见图 2B。

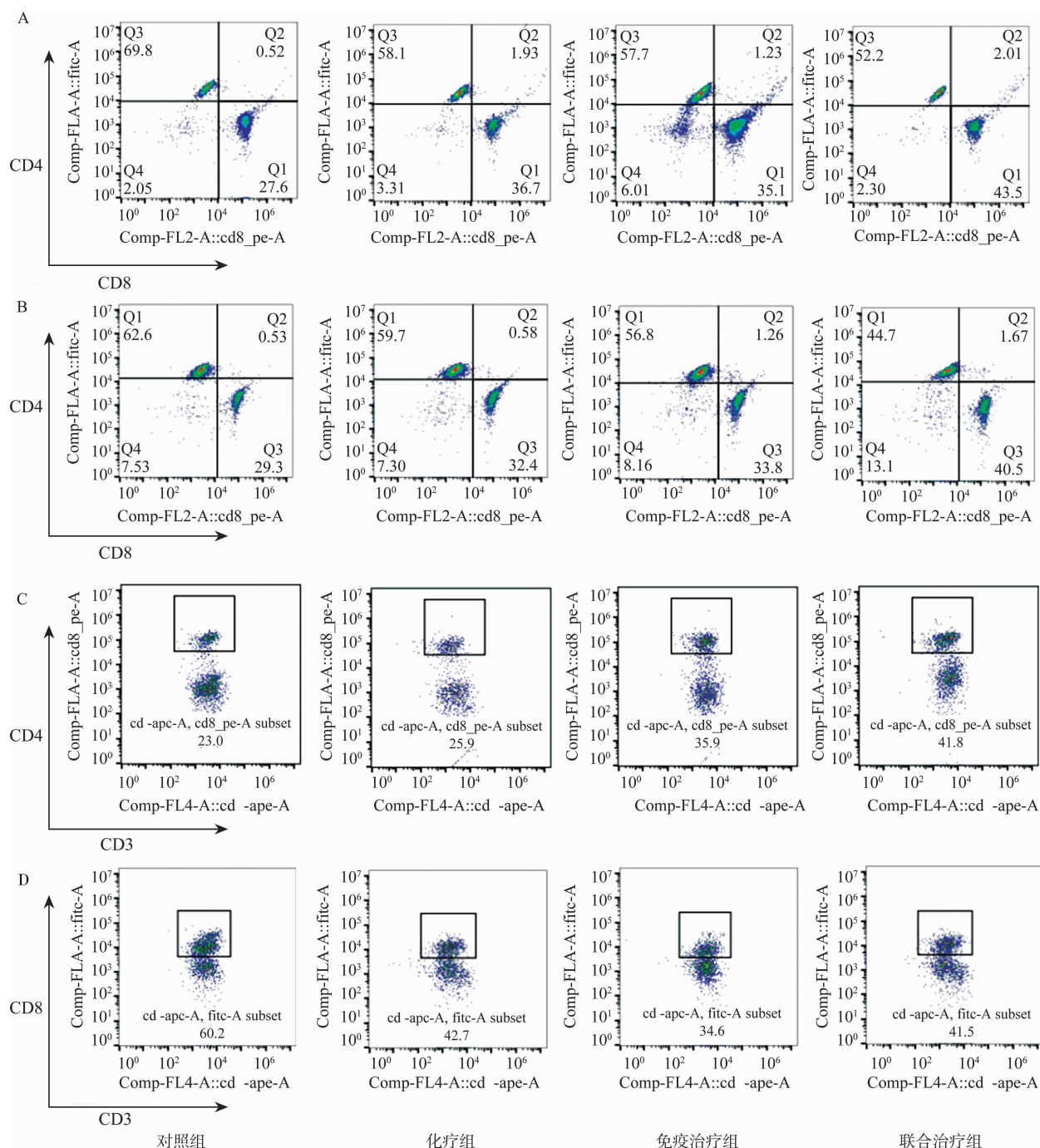
2.4.3 肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞: 对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞比例分别为 (23.5 ± 1.3)%、(26.7 ± 1.4)%、(34.2 ± 2.8)%、(41.3 ± 2.0)% , 4 组间差异具有统计学意义 ($F = 61.65, P < 0.001$), 3 个治疗组肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞比例高于对照组, 差异均具有统计学意义 ($t = 2.86, P = 0.046; t = 7.30, P = 0.002; t = 13.04, P < 0.001$); 联

合治疗组显著高于化疗组 ($t = 10.37, P = 0.001$) 和免疫治疗组 ($t = 4.21, P = 0.014$); 免疫治疗组显著高于化疗组 ($t = 4.98, P = 0.008$)。见图 2D。

2.5 不同组别脾组织中 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞

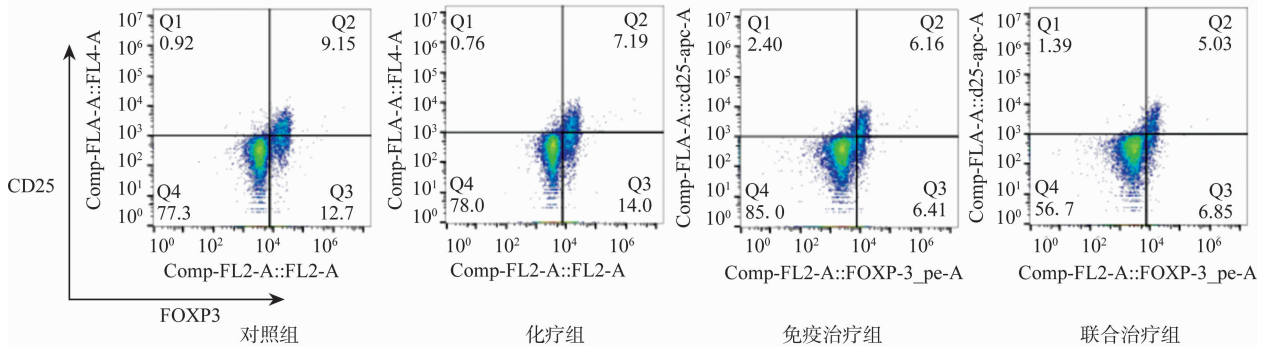
对照组、化疗组、免疫治疗组、联合治疗组 Lewis 肺癌移植瘤小鼠的脾组织中 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞比例分别为 (8.6 ± 0.5)%、(7.2 ± 0.3)%、

(6.3 ± 0.4)%、(5.4 ± 0.4)%，4 组间差异具有统计学意义 ($F = 37.06, P < 0.001$)，3 个治疗组脾组织中 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞比例显著低于对照组，差异具有统计学意义 ($t = 4.46, P = 0.011$; $t = 6.50, P = 0.003$; $t = 9.48, P = 0.001$)；联合治疗组显著低于化疗组 ($t = 6.41, P = 0.003$) 和免疫治疗组 ($t = 2.94, P = 0.042$)，免疫治疗组显著低于化疗组 ($t = 2.91, P = 0.044$)。见图 3。



注: 对照组采用生理盐水; 化疗组采用顺铂; 免疫治疗组采用 PD-1 抑制剂; 联合治疗组采用顺铂 + PD-1 抑制剂; PD-1 为程序性死亡蛋白-1

图 2 不同组别 Lewis 肺癌移植瘤小鼠体内 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞流式细胞图 A 为外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞; B 为脾组织 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞; C 为肿瘤组织 CD4⁺ T 细胞; D 为肿瘤组织 CD8⁺ T 细胞



注:对照组采用生理盐水;化疗组采用顺铂;免疫治疗组采用 PD-1 抑制剂;联合治疗组采用顺铂 + PD-1 抑制剂;PD-1 为程序性死亡蛋白-1

图 3 不同组别 Lewis 肺癌移植瘤小鼠脾组织中 $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ Treg 细胞流式细胞图

3 讨论

本研究结果显示,顺铂单药化疗不但可显著降低 Lewis 肺癌移植瘤小鼠脾组织中 Treg 细胞的比例,还可增加周身和肿瘤微环境中 $CD8^+$ T 细胞的比例,降低 $CD4^+$ T 细胞的比例。Treg 细胞比例的降低,可能是由于化疗杀伤和(或)清除 Treg 细胞所致。虽然有研究显示,化疗可增加 Treg 细胞的比例^[9],但多数研究显示,化疗能够清除或下调 Treg 细胞^[10-11],上调 $CD8^+$ T 细胞的比例^[12-13],与本研究结果相一致。化疗导致 $CD4^+$ T 细胞比例的下降可能与体内 $CD8^+$ T 细胞比例的升高有关^[14]。结果表明,化疗可调整 T 淋巴细胞亚群的比例,下调 Treg 细胞和 $CD4^+$ T 细胞的比例,上调 $CD8^+$ T 细胞比例,从而增强机体免疫功能进而提高机体免疫系统对肿瘤的杀伤作用。

研究表明,PD-1 抑制剂能够通过消耗、减少 Treg 细胞的数量,改善机体的免疫功能,增强机体的抗肿瘤作用^[15-16]。本研究结果显示,PD-1 抑制剂不但能够显著降低 Lewis 肺癌移植瘤小鼠脾组织中 Treg 细胞的比例,还可显著增加周身和肿瘤微环境中 $CD8^+$ T 细胞的比例,降低 $CD4^+$ T 细胞的比例。相关免疫治疗的研究中,关于 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例变化的实验较少,本研究结果显示,肿瘤微环境中联合治疗组的 $CD4^+$ T 细胞的比例显著高于免疫治疗组,考虑可能是由于联合治疗较免疫治疗使肿瘤免疫抑制微环境得到较好改善,促使局部淋巴结的 $CD4^+$ 效应 T 淋巴细胞转移至肿瘤微环境。Treg 细胞比例的降低,可能与 PD-1 抑制剂阻止 $CD4^+$ T 细胞向 Treg 细胞分化有关,而 $CD8^+$ T 细胞比例的升高可能与 PD-1 抑制剂阻止 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞凋亡有关^[17]。本研究结果表明,无论化疗还是 PD-1 抑制剂免疫治疗均能够通过下调 Treg 细胞比例、上调 $CD8^+$ T 细胞比例诱发机体抗肿瘤免疫应答反应^[18],增强机体免疫系统的抗肿瘤作用。因为 Treg 细胞是迄今为止发现的最重

要的免疫抑制细胞,在抑制抗肿瘤免疫应答中起关键作用,控制 Treg 细胞的比例和(或)活性,可提高机体抗肿瘤免疫的功能。而 $CD8^+$ T 细胞是抗肿瘤的主要效应细胞,在杀伤肿瘤细胞中起重要作用,增加其数量和(或)活性,可提高对肿瘤的杀伤作用。

本实验进一步比较了顺铂、PD-1 抑制剂以及顺铂联合 PD-1 抑制剂一线治疗的疗效及各种治疗方案对 T 淋巴细胞亚群的调控情况。实验结果显示,化疗、免疫治疗以及二者的联合治疗虽然均能下调 Treg 细胞比例、上调 $CD8^+$ T 细胞比例,但是,联合治疗组下调 Treg 细胞比例、上调 $CD8^+$ T 细胞比例的幅度却显著高于单纯化疗组和免疫治疗组,而且在抑制肿瘤生长和延长移植瘤小鼠生存期方面联合治疗组也显著优于单纯化疗组和免疫治疗组,说明化疗(顺铂)联合免疫治疗(PD-1 抑制剂)具有协同增效作用。PD-1 抑制剂可通过多种途径恢复和(或)增强免疫效应性 T 细胞对肿瘤的杀伤活性,诱发机体抗肿瘤免疫反应;化疗不但可杀伤肿瘤细胞、减轻肿瘤负荷,还可通过诱导肿瘤细胞免疫原性凋亡改善机体免疫功能,诱发机体抗肿瘤免疫反应,协同机体免疫系统发挥抗肿瘤作用。另外,化疗还能上调 PD-L1 表达^[6],进而增强 PD-1 抑制剂的抗肿瘤作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Updated analysis of KEYNOTE-024: pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(7): 537-546. DOI: 10.1200/JCO.18.00149.
- [2] Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC[J]. N Engl J Med, 2018, 378(24): 2288-2301. DOI: 10.1056/NEJMoa1716948.
- [3] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology

- [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(4): 504-535.
- [4] Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2019, 393(10183): 1819-1830. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- [5] Peng J, Hamanishi J, Matsumura N, et al. Chemotherapy induces programmed cell death-ligand overexpression via the nuclear factor- κ B to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2015, 75(23): 5034-5045. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3098.
- [6] Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 379(21): 2040-2051. DOI: 10.1056/NEJMoa1810865.
- [7] Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model [J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7477-7486. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4639.
- [8] Lesterhuis WJ, Salmons J, Nowak AK, et al. Synergistic effect of CTLA-4 blockade and cancer chemotherapy in the induction of anti-tumor immunity [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61895. DOI: 10.1371/journal.pone.0061895.
- [9] 刘莉,姚军霞,丁乾,等.非霍奇金淋巴瘤患者外周血 CD4⁺CD25^{high}调节性 T 细胞研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1): 199-122.
- [10] Terme M, Tanchot C. Immune system and tumors [J]. Ann Pathol, 2017, 37(1): 11-17. DOI: 10.1016/j.anpat.2016.12.004.
- [11] Rao S, Gharib K, Han A. Cancer immunosurveillance by T cells [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2019, 342: 149-173. DOI: 10.1016/bs.iremb.2018.08.001.
- [12] Liang Y, Lü W, Zhang X, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer [J]. Diagn Pathol, 2018, 13(1): 93. DOI: 10.1186/s13000-018-0770-4.
- [13] Park JH, Jang M, Tarhan YE, et al. Clonal expansion of antitumor T cells in breast cancer correlates with response to neoadjuvant chemotherapy [J]. Int J Oncol, 2016, 49(2): 471-478. DOI: 10.3892/ijo.2016.3540.
- [14] Muranski P, Boni A, Wrzesinski C, et al. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy-how far we can go? [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2006, 3(12): 668-681. DOI: 10.1038/neponc0666.
- [15] Sun NY, Chen YL, Lin HW, et al. Immune checkpoint Ab enhances the antigen-specific anti-tumor effects by modulating both dendritic cells and regulatory T lymphocytes [J]. Cancer Lett, 2019, 444: 20-34. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.11.039.
- [16] Zeng Y, Li B, Liang Y, et al. Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment [J]. FASEB J, 2019, 33(5): 6596-6608. DOI: 10.1096/fj.201802067RR.
- [17] Chen K, Huang HT, Hang WJ, et al. Effects of lung cancer cell-associated B7-H1 on T-cell proliferation in vitro and in vivo [J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49(7): pii: S0100-879X2016000700701. DOI: 10.1590/1414-431X20165263.
- [18] Chen YL, Chang MC, Chen CA, et al. Depletion of regulatory T lymphocytes reverses the imbalance between pro-and anti-tumor immunities via enhancing antigen-specific T cell immune responses [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47190. DOI: 10.1371/journal.pone.0047190.

(收稿日期:2019-05-07 修回日期:2019-06-04)

(本文编辑:孔春燕)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于一稿两投和重复发表问题的处理原则

中华医学会系列期刊作为我国重要的医学信息源期刊,原则上不接受一稿两投或重复发表的论文,读者在这些期刊上所阅读的论文基本上都是原始的、首发的,除非声明是按作者和编辑的意图重新发表的。这一立场符合中国和国际版权法、道德规范及资源使用的成本效益原则。但这一政策并不妨碍下列论文向中华医学会系列期刊投稿:①已经被其他刊物退稿的论文;②发表初步报告后再发表完整的论文,如已在其他刊物或专业学术会议的论文汇编上发表过摘要;③在专业学术会议上宣读,但并未在其他刊物或会议汇编上全文发表或准备全文发表。因此,作者在向中华医学会系列期刊投稿时,必须就以前是否投寄过或发表过同样或类似的文稿向编辑部作充分的说明,以免造成一稿两投或重复发表。如果文稿中部分内容已经发表,作者应在新的文稿中明确指出有关内容并列出相应的参考文献,同时将以前发表的文稿寄给编辑部,以便编辑部决定如何处理新的文稿。

如果一旦出现一稿两投现象,且作者在投稿时没有作这方面的说明,编辑部将立即退稿;如果编辑部在发表前没有了解一稿两投的情况而造成重复发表,编辑部将在本刊发表有关该文稿系重复发表的声明。对于一稿两投或重复发表的情况,编辑部将向作者所在单位和该领域的其他科技期刊进行通报,同时,中华医学会系列期刊两年内将拒绝接受该论文第一作者所撰写的其他文稿。作者向中华医学会系列期刊投稿并收到编辑部回执后 3 个月未接到退稿,则表明该稿件仍在处理中,如果作者欲投寄其他刊物,应事先与编辑部联系并征得编辑部的同意。