

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.005

· 基础研究 (专题) ·

PD-1 抗体增强奥沙利铂体内外抗结肠癌的效果

钟根深^{1a,b}, 孙智洋^{1a}, 陈亚楠^{1a}, 许芝山^{1c}, 杨如^{1c}, 吴敏娜^{1d}, 石焕², 路平^{1a} (1. 新乡医学院 a. 第一附属医院 肿瘤内二科; b. 河南省分子诊断和检验医学协同创新中心 医学检验学院; c. 第一附属医院 生命科学技术研究中心; d. 基础医学院 微生物学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 山东大学附属肿瘤医院 肿瘤科, 山东 济南 250117)

[摘要] **目的:** 探讨奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)联合PD-1抗体对结肠癌的抗肿瘤作用。**方法:** 选用结肠癌细胞系HCT-116和HT-29,用流式细胞术检测细胞中PD-L1的表达。采用T细胞共培养的方法检测OXA预处理HCT-116细胞联合PD-1抗体作用后细胞因子分泌及CD4/CD8亚型变化。建立BALB/c小鼠的结肠癌细胞CT26移植瘤模型,用OXA联合PD-1抗体治疗,评估其抗肿瘤活性;同时采用CD8抗体清除小鼠CD8⁺T细胞,评估CD8⁺T细胞在OXA抗肿瘤中的作用。**结果:** OXA能够显著上调结肠癌细胞表面PD-L1的表达。OXA预处理后的结肠癌HCT-116细胞和T细胞共培养后,与单纯培养的T细胞相比,能降低其培养上清中IL-2、IFN- γ 和TNF的水平(均 $P<0.05$)及体系中CD4⁺记忆性T细胞和CD8⁺T_{EMRA}比率($P<0.05$)、增加CD4⁺($P>0.05$)和CD8⁺($P<0.05$)初始T细胞比率;联合PD-1抗体后,与OXA预处理的HCT-116和T细胞共培养组相比,T细胞培养上清中IFN- γ 和IL-10含量($P<0.05$)以及CD8⁺T_{CM}和T_{EMRA}比率增加($P>0.05$)。体内抑瘤实验表明,OXA联合PD-1抗体可以增强其抗肿瘤活性,抑瘤率显著高于单用OXA组和 α PD-1组(58.2% vs 25.6%、29.1%,均 $P<0.05$);清除CD8⁺T细胞后,OXA的抗肿瘤活性由68.4%下降到46.2%($P<0.05$)。**结论:** OXA联合PD-1抗体具有联合增效的作用,同时CD8⁺T细胞在OXA的抗肿瘤活性中具有重要作用。

[关键词] 奥沙利铂;PD-1抗体;结肠癌;CD8⁺T细胞

[中图分类号] R730.51; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)10-0999-07

PD-1 antibody enhanced anti-tumor efficacy of oxaliplatin against colon cancer *in vitro* and *in vivo*

ZHONG Genshen^{1a,b}, SUN Zhiyang^{1a}, CHEN Yanan^{1a}, XU Zhishan^{1c}, YANG Ru^{1c}, WU Minna^{1d}, SHI Huan², LU Ping^{1a} (1a. Department II of Oncology, the First Affiliated Hospital; 1b. Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, School of Laboratory Medicine; 1c. Research Centre of Life Science and Technology, the First Affiliated Hospital; 1d. Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Department of Oncology, Shandong Cancer Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250117, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-tumor effects of oxaliplatin (OXA) combined with PD-1 antibody on colon cancer. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the expression of PD-L1 in colon cancer cell lines HCT-116 and HT-29. Co-culture method was used to detect the secretion of cytokines and the changes of CD4/CD8 subsets in T-cells that co-cultured with HCT-116 cells, which were pretreated with OXA in combination with/without PD-1 antibody; The CT26 transplanted tumor model of colon cancer in BALB/c mice was established and treated with the combination of OXA and PD-1 to evaluate their anti-tumor efficacy. Meanwhile, CD8 antibody was used to scavenge CD8⁺T cells in mice, and to evaluate the role of CD8⁺T cells in the anti-tumor effect of OXA *in vivo*. **Results:** OXA could significantly increase the expression of PD-L1 on the surface of colon cancer cells. Compared with pure T-cells, the T cells co-cultured with colon cancer HCT-116 cells that pre-treated by OXA, exhibited significantly reduced IL-2, IFN- γ and TNF levels (all $P<0.05$) in its culture supernatant and decreased ratio of CD4⁺ memory T cell / CD8⁺T_{EMER} ($P<0.05$), whereas there was increased cell proportion of the CD4⁺ ($P>0.05$) and CD8⁺ ($P<0.05$) naïve T cells. After co-treated with PD-1 antibody, compared with the single

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81602709;81872361);河南省高校重点科研资助项目(No.15A320063, No.16A310022);河南省骨干教师培养计划(No.2016GGJS-105)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Youth Scientists of China (No. 81602709; 81872361), the Key Scientific Research Projects for Higher Education of Henan Province (No. 15A320063, No.16A310022), and the Young Backbone Teachers Fellowship in Henan Province (No.2016GGJS-105)

[作者简介] 钟根深(1981-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤生物治疗基础研究,E-mail:zhonggs@xxmu.edu.cn

treatment of OXA, IFN- γ and IL-10 content ($P<0.05$) in culture supernatant and the subsets of CD8 $^{+}$ T $_{CM}$ and T $_{EMRA}$ ratio ($P>0.05$) were increased. *In vivo* experiments showed that OXA combined with PD-1 antibody could enhance its anti-tumor activity, the tumor suppression rates were 25.6% (OXA) and 29.1% (α PD-1), respectively, however, the rate of tumor inhibition was increased to 58.2% when combined ($P<0.05$, compared to OXA or α PD-1 group). After scavenging CD8 $^{+}$ T cells in mice, the antitumor activity of OXA dropped from 68.4% to 46.2% ($P<0.05$). **Conclusion:** OXA combined with PD-1 antibody had synergistic anti-tumor effect, and CD8 $^{+}$ T cells played an important role in the antitumor activity of OXA.

[Key words] oxaliplatin (OXA); PD-1 antibody; colon cancer; CD8 $^{+}$ T cell

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(10): 999-1005. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.005]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内癌症相关死亡的主要原因之一,其发病率和病死率以3%~4%速度逐年上升。中国CRC的年发病人数约为37万,位居所有肿瘤的第5位^[1]。第3代铂类抗癌药奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)的作用机制与其他铂类药作用相同,均以肿瘤DNA为靶作用部位,通过铂原子与肿瘤细胞DNA形成交叉联结,拮抗其复制和转录,从而发挥抗肿瘤作用^[2]。OXA在临床结直肠癌治疗中应用广泛,具有较好的临床治疗效果,然而常见的周围神经毒性副作用也是限制其大剂量长期使用的因素之一^[3]。PD-1及其配体PD-L1是当前抗肿瘤研究的热点。作为CD28超家族的成员之一,PD-1通过与其配体PD-L1/PD-L2结合,发挥免疫抑制作用^[4-5]。以PD-1/PD-L1为靶点的多种抗体药物已经上市,并获得了良好的抗肿瘤效果。目前肿瘤的内科治疗以联合治疗为主,已有大量研究^[6-7]表明,化疗可以上调PD-L1的表达。因此,为提高OXA治疗CRC的临床疗效、降低其毒副作用,本研究进行了OXA联合PD-1抗体抗结肠癌的体内外实验研究,并进一步初步探索了免疫相关因素在OXA抗肿瘤中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株、实验动物及主要试剂

人结肠癌HCT-116、HT-29和小鼠CT26结肠癌细胞系为本实验室保存。6~8周龄、雌性、体质量18~22 g的BALB/c小鼠[实验动物合格证号:SCXK(京)2016-0011]购自北京维通利华实验动物技术有限公司。人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物有限公司, OXA购自江苏恒瑞医药股份有限公司(规格:50 mg),人PD-1抗体(派姆单抗,规格:400 mg)购自默沙东有限公司,抗小鼠PD-1(α PD-1)和CD8(α CD8)抗体购自BioXcell公司, RPMI-1640细胞培养基、胎牛血清购自HyClone公司, Th1/Th2/Th17 CBA试剂盒和CD3/4/8/45荧光抗体均购自BD公司, CD45RA、CD45RO、CCR-7购自eBioscience公司, PD-L1荧光抗体购自Biolegend公司。Dynabeads CD3/CD28磁珠购自Thermo Fisher。

1.2 流式细胞术检测结肠癌细胞PD-L1的表达

在对数生长培养的结肠癌HCT-116、HT-29和CT-26细胞中,加入终浓度为5 μ g/ml的OXA常规培养24 h后,胰酶消化后收集细胞制备成单细胞悬液,然后加入荧光标记的PD-L1抗体,采用流式细胞术分析OXA作用前后对PD-L1表达的变化。

1.3 OXA预处理结肠癌细胞后联合PD-1抗体作用对Th1/Th2/Th17的影响

人CD3 $^{+}$ T细胞的培养:在知情同意下,抽取3个健康人的外周抗凝血20 ml,采用淋巴细胞分离液分离其单个核细胞,具体培养方案参考本课题组前期发表的文献^[8]。

24孔板培养的对数生长期的结肠癌HCT-116细胞,经OXA(5 μ g/ml)预处理24 h后,吸取培养上清丢弃, PBS洗涤2遍后,加入静息24 h的人CD3 $^{+}$ T细胞共培养,部分孔加入抗人PD-1抗体(终质量浓度为1 mg/ml), 48 h后采用CBA试剂盒检测Th1/Th2/Th17的浓度,并用流式细胞术检测共培养的CD3 $^{+}$ T细胞中CD4 $^{+}$ 初始T细胞(Naïve T cell; CD4 $^{+}$ CD45RA $^{+}$)、CD4 $^{+}$ 记忆T细胞(memory T cell; CD4 $^{+}$ CD45RO $^{+}$)、CD8 $^{+}$ 初始T细胞(Naïve T cell; CD8 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{+}$)、CD8 $^{+}$ 中央型记忆T细胞(central memory T cell, T $_{CM}$; CD8 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{+}$)、CD8 $^{+}$ 效应型记忆T细胞(effector memory T cell, T $_{EM}$; CD8 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$)、CD8 $^{+}$ 效应型记忆T细胞(T $_{EMRA}$; CD8 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$)的百分率。

1.4 构建结肠癌CT26细胞移植瘤动物模型及观察OXA联合PD-1抗体抗癌效果

6~8周龄的BALB/c小鼠按照SPF级别的条件饲养1周后,接种CT26小鼠结肠癌细胞于右侧腋下,接种细胞数量为 $2 \times 10^6/100 \mu$ l/只。将接种肿瘤后的小鼠随机分成4组:对照组、OXA组、 α PD-1组以及OXA+ α PD-1组。接种48 h后小鼠经尾静脉给药, OXA浓度为2.5 mg/kg, 1次/周,共2次。同时经小鼠腹腔给予抗小鼠PD-1抗体 α PD-1, 200 μ g/只, 2次/周,共4次。期间称小鼠体质量2次/周,并用游标卡尺测量肿瘤体积。小鼠肿瘤接种约2周后处死小鼠,剥离肿瘤称质量,计算肿瘤抑制率。同时心脏取血,

用流式细胞术检测小鼠外周血中 CD45⁺ 细胞的含量。

1.5 构建清除 CD8⁺ T 细胞的小鼠结肠癌移植瘤模型并观察 OXA 联合 CD8⁺ 抗体的抗肿瘤效果

方法同 1.4, 接种 CT26 小鼠结肠癌细胞于饲养 1 周后的 BALB/c 小鼠右侧腋下, 接种数量为 $2 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ /只。接种肿瘤后的小鼠随机分成 4 组, 分别为对照组、OXA 组、 αCD8 组以及 OXA + αCD8 组。接种 48 h 后小鼠经尾静脉注射 OXA (浓度为 5 mg/kg), 1 次/周, 共 2 次, 同时经小鼠腹腔给予抗小鼠 CD8 抗体 αCD8 , 200 μg /只, 2 次/周, 共 4 次。期间称量小鼠质量 2 次/周, 并用游标卡尺测量肿瘤体积。接种约 2 周后处死小鼠, 剥离肿瘤称质量, 计算肿瘤抑制率。同时心脏取抗凝血, 用流式细胞术检测小鼠外周血中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计学软件分析, 所有数据均为重复 3 次实验所得, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用双尾成对 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 OXA 上调结肠癌细胞 PD-L1 表达

流式细胞术检测结肠癌细胞 HT-19、HCT-116 和 CT26 表面 PD-L1 表达情况, 在正常情况下, 3 种细胞均在一定程度上表达 PD-L1, 其中以 HT-29 的 PD-L1 阳性率最高。用 OXA 处理后, PD-L1 表达的平均荧光强度进一步增加, 说明 OXA 能够上调结肠癌细胞 PD-L1 的表达。

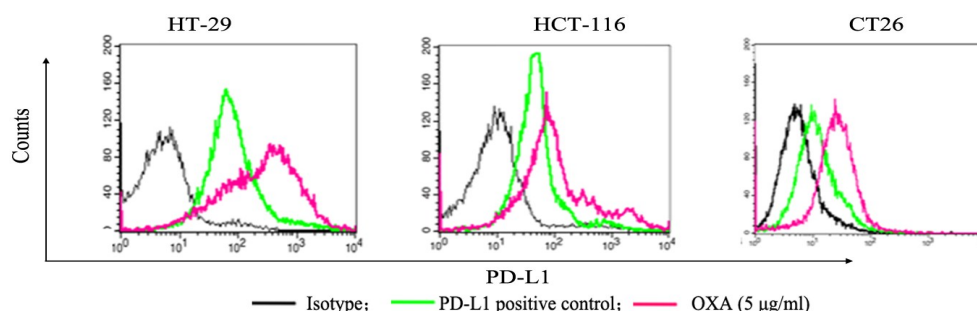


图1 OXA 上调结肠癌细胞 PD-L1 表达

Fig. 1 OXA up-regulated the expression of PD-L1 in colon cancer cells

2.2 OXA 预处理的 HCT-116 细胞与人 T 细胞共培养及联合 PD-1 抗体相关细胞因子的分泌

流式细胞术 CBA 法分析各种细胞培养上清中 Th1/Th2/Th17 的含量, 结果发现 (图 2), 单独的 T 细胞能够分泌较高的 IFN- γ 、IL-2 和 TNF ($t=0.025$, 0.0038 , 0.0037 , $P < 0.05$, 与 HCT-116 对照组相比); 当 T 细胞与 HCT-116 细胞共培养后, 其分泌的 IFN- γ 和 TNF 有所下降 ($t=0.808$, 0.577 , $P > 0.05$, 与单独 T 细胞培养上清相比), 当其与 OXA 预处理的 HCT-116 共培养后, 其分泌的 IFN- γ 显著降低 ($t=0.0335$, $P < 0.05$), IL-2 和 TNF 也有所下降 ($t=0.108$, 0.258 , $P > 0.05$, 与单独 T 细胞培养上去相比); 而当 T 细胞和 OXA 预处理的 HCT-116 以及加入 $\alpha\text{PD-1}$ 后, 培养上清中的 IFN- γ 、IL-2、IL-10 和 IL-17A 均有所增加, 其中 IFN- γ 的分泌水平得以恢复, 而 IL-10 增加显著 ($t=0.02876$, $P < 0.05$), 而对 IL-4、TNF 影响不明显。同时发现, T 细胞和癌细胞共培养后, 上清液中 IL-6 显著增加。

2.3 OXA 预处理结肠癌细胞与人 T 细胞共培养及联合 PD-1 抗体对 T 细胞表型的影响

如图 3 所示, T 细胞与癌细胞 HCT-116 共培养后, CD4⁺ 初始 T 细胞和 CD8⁺ 初始 T 细胞均增加 ($t=0.574$,

0.415 , $P > 0.05$), 而 CD4⁺ 记忆性 T 细胞 ($t=0.0363$, $P < 0.05$) 和 CD8⁺ T_{EM} ($t=0.402$, $P > 0.05$)、T_{EMRA} 细胞 ($t=0.415$, $P > 0.05$) 有所减少; 当与 OXA 预处理的 HCT-116 共培养后, 与单独的 T 细胞相比, CD4⁺ ($t=0.082$, $P > 0.05$) 和 CD8⁺ ($t=0.040$, $P < 0.05$) 的初始 T 细胞进一步增加, 然 CD8⁺ T_{CM} 也增加不少 ($t=0.048$, $P < 0.05$), 而 CD4⁺ 记忆性 T 细胞 ($t=0.0515$, $P > 0.05$) 和 CD8⁺ T_{EMRA} ($t=0.040$, $P < 0.05$) 比率减少; 当共培养体系中加入 $\alpha\text{PD-1}$ 抗体后, 能减少体系中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 初始 T 细胞比率 ($t=0.233$, 0.607 , 均 $P > 0.05$), 同时增加 CD8⁺ T_{CM} 和 T_{EMRA} 的比率 ($t=0.560$, 0.607 , 均 $P > 0.05$)。

2.4 OXA 联合 PD-1 抗体增强抗小鼠结肠癌 CT26 移植瘤的效果

成功建立小鼠结肠癌 CT26 细胞移植瘤模型。经 OXA 联合 PD-1 抗体治疗后, 与对照组相比, 抗肿瘤活性明显提高, 移植瘤体积显著减小 ($t=0.0017$, $P < 0.01$; 图 4A), 抑瘤率显著高于单用 OXA 或 $\alpha\text{PD-1}$ 组 (58.2% vs 25.6% 、 29.1% , $t=0.0267$, 0.0414 , 均 $P < 0.05$)。同时发现小鼠血中单个核细胞中的 CD45⁺ 细胞有所增加 ($t=0.0310$, $P < 0.05$; 图 4B)。实验结果说明, 联用 $\alpha\text{PD-1}$ 抗体显著增加 OXA 的抗肿瘤效果。

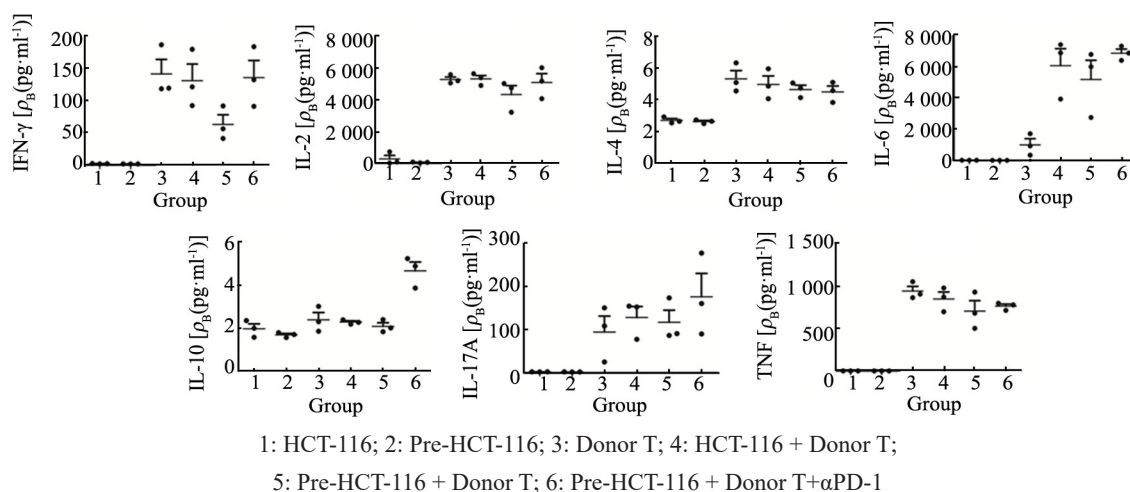


图2 T细胞与HCT-116细胞共培养上清液中Th1/Th2/Th17细胞因子的变化

Fig.2 The changes of Th1/Th2/Th17 cytokines in the co-culture supernatant of T cells with colon cancer HCT-116 cells or combined with PD-1 antibody

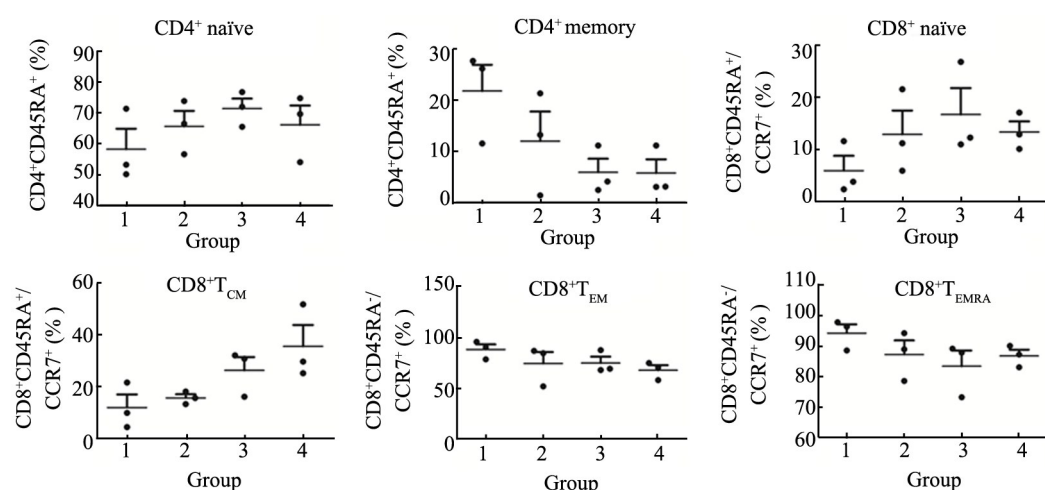
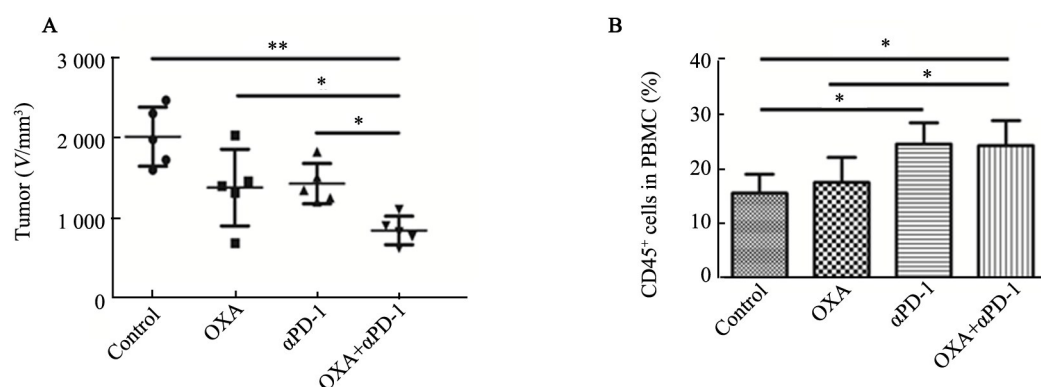


图3 T细胞与结肠癌细胞HCT-116共培养后CD4⁺ T、CD8⁺ T细胞相关亚型变化

Fig.3 The subset changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cells after co-culture of T cell with colon cancer HCT-116 or combined with PD-1 antibody



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

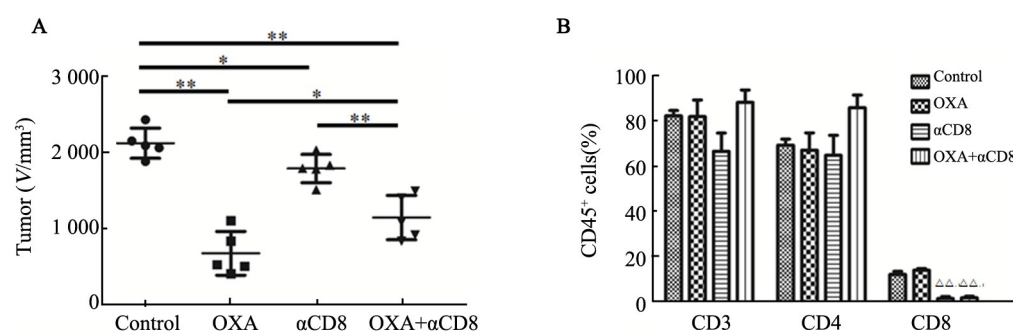
图4 OXA+PD-1抗体体内抗肿瘤效果及小鼠外周血中CD45⁺细胞变化

Fig.4 Antitumor efficacy of OXA combined with PD-1 antibody *in vivo* (A) and the change of CD45⁺ cells in PBMC of mice (B)

2.5 敲除 CD8⁺ T 细胞降低 OXA 的抗肿瘤效果

小鼠注射 CD8 抗体后,流式细胞术分析结果显示,小鼠血中 CD8⁺ T 细胞数量显著低于对照组 (12.26% vs 1.00%, $t=0.0004$, $P<0.01$; 图 5B),说明注射 CD8 抗体能够有效清除 CD8⁺ T 细胞。同时,结肠癌 CT26 移植瘤小鼠的抗肿瘤实验表明,清除 CD8⁺ T

后,OXA 的抗肿瘤活性降低,其肿瘤抑制率从 68.4% 下降到 46.2% ($t=0.0491$, $P<0.05$; 图 5A),实验结果说明,CD8⁺ T 细胞介导的抗肿瘤免疫在 OXA 的抗肿瘤作用方面有着重要的作用。同时,单用 CD8 抗体也能在一定程度上延缓小鼠移植瘤的生长 ($t=0.026$, $P<0.05$)。



A: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; B: ** $P<0.01$ vs Control group

图5 清除 CD8⁺ T 细胞后 OXA 抗 CT26 小鼠结肠癌效果(A)及外周血中 CD3⁺、CD4⁺ and CD8⁺ T 细胞的变化(B)

Fig. 5 The antitumor efficacy of OXA when scavenging CD8⁺ T cells in mice (A) and the CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cell ratio in mice PBMC (B)

3 讨论

CRC 的联合化疗是当前临床治疗的常用手段之一,其中 OXA 在结直肠癌 FOLFOX 方案中是重要的组成成分之一^[9-10]。近年来,以 PD-1/PD-L1 为代表的肿瘤免疫治疗在肿瘤的治疗中展现了其重要的作用,抑制/下调 PD-1/PD-L1 信号通路能够有效的提高很多肿瘤的抗肿瘤效果^[11-13]。CRC 方面,目前也正在探索 OXA 和 PD-1/PD-L1 抗体的联合治疗^[14-15]。目前 PD-1/PD-L1 抗体已经被美国 FDA 批准上市,用于黑色素瘤、肺癌、膀胱癌等的临床治疗。2018 年 6 月和 7 月,中国 CFDA 也批准了针对 PD-1 抗体的纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗上市,用于相关肿瘤的治疗。然在 CRC 中其 PD-1 抗体联合 OXA 是否有联合增效作用,仍不十分明确。因此探索 PD-1/PD-L1 抗体在 CRC 中联合 OXA 的治疗有着重要的临床转化价值。

本研究表明,OXA 能够显著上调人结肠癌 HCT-116、HT-29 细胞和小鼠结肠癌 CT26 细胞表面 PD-L1 的表达,说明 PD-L1 是一个细胞内应激分子,在 DNA 损伤发生后,PD-L1 即能上调。而 PD-L1 上调,常预示着肿瘤免疫抑制程度的增加。同时,体外癌细胞和 T 细胞共培养实验中的结果也表明,OXA 预处理后的 HCT-116 和 T 细胞共培养,能够降低培养上清中 IFN- γ 的分泌,说明与癌细胞共培养能够抑制 T 细胞

分泌 Th1 型细胞因子的功能,降低其抗肿瘤的效果;而在共培养体系中加入 PD-1 抗体后,细胞培养上清液中的 IL-2 和 IFN- γ 显著增加,表明阻断 PD-1/PD-L1 信号通路能够增强 T 细胞分泌 Th1 型细胞因子的水平,这可能和 OXA 预处理后,一方面增加了结肠癌细胞表面抗原暴露的水平,从而增强了 CD8⁺ T 细胞的识别和杀伤活性;同时,PD-1 抗体的加入,阻断了 PD-L1 对 T 细胞的信号抑制作用,从而进一步提高 T 细胞对肿瘤的杀伤效果。然而,Th2 型的 IL-10 亦增加明显,通常认为 IL-10 能抑制 T 细胞的功能。然而近年来研究^[16]表明,IL-10 在抗肿瘤免疫中起着正向的积极作用,其可能能够促进 CD8⁺ 效应/记忆性 T 细胞的生成。已知嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)临床治疗中的细胞因子风暴问题主要是 IL-6 的大量分泌^[17]。因此加入 PD-1 抗体后共培养上清中 IL-6 的增加,也可能意味着 T 细胞免疫功能的增强。

外周血中, T_{CM} 和 T_{EM} 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中相对比率是动态变化的,已知人 CD8⁺ T 细胞能至少分成 4 个亚群,幼稚型的 CD8T 细胞和 T_{CM} 具有较高的增殖能力,但缺乏直接的效应杀伤功能;而 CD8⁺ T_{EM} 和 T_{EMRA} 增殖能力较低,但能分泌细胞因子和执行细胞毒性杀伤功能,特别是 CD8⁺ T_{EMRA} 分泌的穿孔素等杀伤性细胞因子较高^[18];同时,CD4⁺ 初始和记忆性 T 细胞的功能特性与 CD8⁺ T 细胞相关亚型类似^[19]。因此,癌细胞 HCT-116 与 T 细胞共培养后,能增加其中

CD4⁺和CD8⁺初始T细胞,减少其具有记忆或杀伤活性的CD8⁺T_{EM}和T_{EMRA};当OXA预处理的HCT-116与T细胞共培养后,能增加这种趋势。说明OXA预处理能够增加HCT-116对T细胞的免疫抑制,这可能与PD-L1等上调导致的免疫抑制有关。当共培养体系中加入PD-1抗体后,能够逆转这种癌细胞对T细胞免疫抑制的趋势,增加CD8⁺T_{CM}和T_{EMRA}的比率,说明HCT-116癌细胞对T细胞亚型的影响主要是由其PD-1/PD-L1信号途径发生免疫抑制的,而采用PD-1抗体阻断这条信号通路,可以逆转肿瘤细胞HCT-116对T细胞的免疫抑制,增加T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。

小鼠体内实验中,OXA和PD-1抗体的联用能够显著增加对结肠癌CT26细胞的抗肿瘤效果,其肿瘤抑制率显著高于单用OXA或单用αPD-1(58.2% vs 25.6%或29.1%),说明两者联合具有显著的协同增效作用,而且因为减少了OXA的使用剂量,其毒副作用更低,小鼠体质量与对照组相比无显著变化,甚至有所增加,说明两者联合方案可行。同时研究结果表明,PD-1抗体能够增加小鼠外周血中CD45⁺细胞的比例,这一现象有待进一步深入研究。临床OXA应用中导致的外周神经毒性副作用是一个难题,降低其使用剂量,将有效规避其在临床的副作用,并增加抗癌效果,使患者获益。然而,OXA抗肿瘤过程中,免疫细胞是否参与其抗肿瘤作用,并不明确,因此本研究进一步采用抗小鼠的CD8抗体消除小鼠的CD8⁺T细胞,评估OXA的抗CT26结肠癌的效果,结果表明,CD8抗体居然能在一定程度上延缓肿瘤的生长($P<0.05$),推测这可能CD8抗体能清除CD8⁺Treg和打破实体肿瘤免疫抑制微环境有关^[20];同时也意味着肿瘤免疫治疗的复杂性,具体机制有待进一步深入探究。然而当清除CD8⁺T细胞后,OXA的抗肿瘤作用亦明显下降,其肿瘤抑制率从68.4%下降到46.2%($P<0.05$),说明抗肿瘤免疫因素在OXA的抗肿瘤作用中有着不可小觑的作用,OXA发挥抗肿瘤作用需要CD8⁺T细胞的协助,这也是本研究初次报道免疫因素在OXA抗结肠癌中的重要作用。

总之,本研究探索了OXA上调结肠癌HCT-116细胞PD-L1表达,并影响T细胞细胞因子分泌和CD4/8亚型的比率;同时研究了OXA联合PD-1抗体协同增效的作用,并初次表明CD8⁺T细胞在OXA抗肿瘤中的重要作用。研究结果为其抗肿瘤的机制提供了新的科学假说,亦为后续CRC基于OXA的临床综合治疗提供了数据参考。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BADDE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] BONETTI A, GIULIANI J, MUGGIA F. Targeted agents and oxaliplatin-containing regimens for the treatment of colon cancer[J/OL]. Anticancer Res, 2014, 34(1): 423-434[2018-07-30]. <http://ar.iiar-journals.org/content/34/1/423.long>.
- [3] BEIJERS A J, MOLS F, VREUGDENHIL G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration[J]. Support Care Cancer, 2014, 22(7): 1999-2007. DOI: 10.1007/s00520-014-2242-z.
- [4] 王月华,胡志远. PD-1/PD-L1在肿瘤免疫逃逸中的作用机制及其临床应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017,24(7): 784-790. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.015.
- [5] PARDOLL D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. DOI: 10.1038/nrc3239.
- [6] MESNAGE S J L, AUGUSTE A, GENESITE C, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC)[J]. Ann Oncol, 2017, 28(3): 651-657. DOI: 10.1093/annonc/mdw625.
- [7] CHACON J A, SCHUTSKY K, POWELL D J. The impact of chemotherapy, radiation and epigenetic modifiers in cancer expression of immune inhibitory and stimulatory molecules and anti-tumor efficacy[J / OL]. Vaccines, 2016, 4(4). pii: E43[2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192363/>. DOI: 10.3390/vaccines4040043.
- [8] 钟根深,尤朵,陈亚楠,等. 过表达IL-18的T细胞对胰腺癌细胞SW-1990的杀伤作用[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(9): 1251-1256. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2017.09.009.
- [9] FUMET J D, ISAMBERT N, HERVIEU A, et al. Phase Ib/II trial evaluating the safety, tolerability and immunological activity of durvalumab (MEDI4736) (anti-PD-L1) plus tremelimumab (anti-CTLA-4) combined with FOLFOX in patients with metastatic colorectal cancer[J/OL]. ESMO Open, 2018, 3(4): e000375[2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6012564/>. DOI: 10.1136/esmoopen-2018-000375.
- [10] 苏正曙,陈建望,孙余挺. 替吉奥联合奥沙利铂一线治疗晚期结肠直肠癌的临床分析[J]. 实用肿瘤杂志, 2017,32(1): 77-79.
- [11] SUI H, MAN N, WANG Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for non-small-cell-lung cancer: toward personalized medicine and combination strategies[J/OL]. J Immunol Res, 2018, 2018: 6984948[2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/30159341/>. DOI: 10.1155/2018/6984948.
- [12] SWAIKA A, HAMMOND W A, JOSEPH R W. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy[J]. Mol Immunol, 2015, 67(2 Pt A): 4-17. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.009.
- [13] 陈晓彤,刘宝瑞. T细胞受体工程化T细胞抗肿瘤治疗的现状与挑战[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(8): 755-761. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.001.
- [14] DOSSET M, VAGAS T R, LAGRANGE A, et al. PD-1/PD-L1 path-

- way: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7 (6): e1433981[2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5980491/>. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1433981.
- [15] O'NEIL B H, WALLMARK J M, LORENTE D, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2017; 12(12): e0189848[2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5746>. DOI: 10.1371/journal.pone.0189848.
- [16] GEGINAT J, LARGHI P, PARONI M, et al. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer[J/OL]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 30: 87-93[2018-07-30]. <http://sciencedirect.com/science/journal/13596101>. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.003.
- [17] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management[J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3321-3330. DOI: 10.1182/blood-2016-04-703751.
- [18] GEGINAT J, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines[J]. *Blood*, 2003, 101 (11): 4260-4266. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3577.
- [19] SONG K, RABIN R L, HILL B J, et al. Characterization of subsets of CD4⁺ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (22): 7916-7921. DOI: 10.1073/pnas.0409720102.
- [20] VIEYRA-LOBATO M R, VELA-OJEDA J, MONTIEL-CERVANTES L, et al. Description of CD8⁺ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in Graft-versus-Host and Infectious diseases, autoimmunity, and cancer[J/OL]. *J Immuno Res*, 2018; 2018: 3758713 [2018-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6098849/>. DOI: 10.1155/2018/3758713.

[收稿日期] 2018-08-02

[修回日期] 2018-09-04

[本文编辑] 党瑞山