

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.013

## 可溶性程序性死亡蛋白-1 抗肿瘤临床应用的研究进展

### Research progress on clinical application of soluble PD-1 in anti-tumor therapy

王琦 综述; 蒋敬庭 审阅(苏州大学附属第三医院 肿瘤生物诊疗中心, 江苏省肿瘤免疫治疗工程技术研究中心, 苏州大学细胞治疗研究院, 江苏 常州 213003)

**[摘要]** 程序性死亡蛋白-1(programmed death protein 1, PD-1)是表达在T细胞表面的一种重要的免疫抑制穿膜蛋白,在限制慢性炎症、感染或肿瘤中T细胞的活性方面起重要作用。可溶性PD-1(soluble PD-1, sPD-1)是由PD-1缺失3号外显子的转录剪接体转录翻译而来,无法形成穿膜区,但其具有胞外结构域,具有与配体PD-L1/PD-L2结合的能力,能激活T细胞并促进DC成熟,而发挥抗肿瘤作用。随着免疫疗法及免疫检查点阻断治疗的出现并逐渐成为肿瘤治疗的新兴手段,关于PD-1及其抗体的基础及临床转化研究也成为肿瘤研究的热点之一。不同形式的PD-1被发现,意味着PD-1可能在机体中发挥着更加复杂及多面的功能,因此对于sPD-1的研究也逐渐展开及深入。本文就sPD-1作为肿瘤诊断、疗效预测及预后评估的潜在标志物及联合抗肿瘤免疫治疗中的临床应用研究进展作一综述,以期了解sPD-1在抗肿瘤治疗中的重要作用,为肿瘤免疫治疗提供新思路、新方法和新策略。

**[关键词]** 程序性死亡蛋白-1(PD-1);可溶性PD-1(sPD-1);PD-L1;肿瘤;免疫治疗;生物标志物

**[中图分类号]** R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)07-0732-06

肿瘤是严重威胁人类健康和生命的常见病和多发病。随着免疫疗法及免疫检查点阻断治疗的出现并逐渐成为肿瘤治疗的新兴手段,关于程序性死亡蛋白-1(programmed death protein 1, PD-1)及其抗体的基础及临床转化研究也成为肿瘤研究的热点之一。PD-1/PD-1配体1(PD-L1又称CD274或B7-H1)免疫治疗是新型抗肿瘤免疫疗法,通过阻断PD-1/PD-L1信号通路,利用人体自身免疫系统使肿瘤细胞死亡,具有治疗多种肿瘤的潜力<sup>[1]</sup>。共刺激分子通常以膜结合型和可溶型两种表达形式存在,不同形式的PD-1/PD-L1被发现,意味着PD-1/PD-L1可能在机体中发挥着更加复杂及多面的功能。在针对PD-1/PD-L1的研究<sup>[2]</sup>中,研究主体为膜结合型PD-1/PD-L1(membrane-bound forms of PD-1/PD-L1, mPD-1/PD-L1)。近年来随着人们对于可溶性PD-1(soluble PD-1, sPD-1)研究的展开及深入,意识到sPD-1对调控机体免疫系统具有重要作用并与多种免疫相关疾病关系密切,不仅能成为潜在生物标志物,还能为肿瘤免疫治疗提供新思路、新方法和新策略。因此,以下就sPD-1作为肿瘤诊断、疗效预测及预后评估的潜在标志物及联合抗肿瘤免疫治疗中的临床应用研究进展进行综述。

#### 1 sPD-1的结构与功能

用CD3和CD28抗体刺激人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)48 h后,克隆出5种PD-1 mRNA的转录剪接体:全长型PD-1(full length form PD-1, flPD-1)、PD-1 $\Delta$ ex2、PD-1 $\Delta$ ex3、PD-1 $\Delta$ 2,3和PD-1 $\Delta$ 2,3,4。2号外显子转录翻译形成细胞外IgV

样结构域,3号外显子形成穿膜区,4号和5号外显子形成细胞内结构域<sup>[3-4]</sup>。(1)flPD-1代表完全翻译的全长型PD-1;(2)PD-1 $\Delta$ ex2缺失2号外显子;(3)PD-1 $\Delta$ ex3缺失3号外显子且无法形成穿膜区,所以其产物为PD-1分子的可溶性形式sPD-1,但由于其细胞外结构域是完整的,sPD-1具有与PD-L1/PD-L2结合的能力,从而阻断PD-1穿膜形式转导的负信号;(4)PD-1 $\Delta$ 2,3缺失2,3号外显子,PD-1 $\Delta$ ex2、PD-1 $\Delta$ ex3、PD-1 $\Delta$ 2,3这3种选择性剪接体的开放阅读框未受到影响;(5)PD-1 $\Delta$ 2,3,4缺失2,3,4号外显子,直接导致在5号外显子中提前出现TGA终止密码子<sup>[5]</sup>。CD3和CD28抗体激活后,PD-1 $\Delta$ ex3和flPD-1表达水平同步上升,推测sPD-1与PD-1之间存在重要的相互作用,可能参与维持外周自我免疫耐受

**[基金项目]** 国家重点研发项目资助(No.2018YFC1313400);国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究基金项目(No.31729001);国家自然科学基金资助项目(No.81972869, No.81902386);江苏省重点研发计划专项资金项目(No.BE2018645);常州市卫生健康委员会青苗人才计划(No.CZQM2020018)。Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No.2018YFC1313400), the Joint Research Fund for Overseas Chinese, Hong Kong and Macao Scholars (No.31729001), the National Natural Science Foundation of China (No.81972869, No.81902386), the Key Research and Development Project of Science and Technology Department of Jiangsu Province (No.BE2018645), and the Young Talent Development Plan of Changzhou Health Commission (No.CZQM2020018)

**[作者简介]** 王琦(1988—),女,博士生,主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: wangqi88@suda.edu.cn

**[通信作者]** 蒋敬庭(JIANG Jingting, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗及肿瘤免疫微环境研究, E-mail: jiangjingting@suda.edu.cn

及预防自身免疫性疾病。在未受刺激的PBMC中,PD-1 $\Delta$ ex3 转录剪接体的mRNA表达水平显著高于flPD-1,表明sPD-1可能在免疫应答的早期起重要作用<sup>[2]</sup>。

sPD-1的免疫调节作用主要体现在以下3个方面:(1)sPD-1具有与PD-L1/PD-L2结合的功能,并靶向肿瘤。sPD-1与mPD-L1/mPD-L2结合可以阻止mPD-1与mPD-L1/mPD-L2的结合从而抵抗mPD-1介导的对T细胞的“刹车”效应<sup>[6-7]</sup>。sPD-1通过干涉mPD-1与mPD-L1的相互作用远程激活T细胞,因此sPD-1有着与PD-1单抗相似的抗肿瘤机制,并且sPD-1与PD-1单抗相比具有更好的疗效和潜力。首先,sPD-1能抑制PD-L1/PD-1、PD-L2/PD-1及PD-L1/B7-1(CD80)的结合,解除对T细胞免疫应答的抑制效应。其次,要达到相同的疗效,PD-1单抗与sPD-1相比需要更高的频次与剂量<sup>[8]</sup>。与PD-1单抗免疫治疗不同,持续但较低水平的sPD-1在减少副作用的同时,仍有较强的治疗作用<sup>[9]</sup>。根据sPD-1的这个功能,将其片段与腺病毒进行重组,在肿瘤部位局部接种后,可降低肿瘤微环境对T细胞的抑制作用,增强T细胞毒性从而抑制肿瘤的生长<sup>[10]</sup>。另外,同时表达胸苷激酶和sPD-1的腺病毒还可通过增强CD8<sup>+</sup>T细胞的应答来增强抗肿瘤免疫<sup>[11]</sup>。(2)sPD-1能促进DC成熟。通过共转染sPD-1 DNA,可以上调DC成熟的主要表面标志物主要组织相容性复合体II(major histocompatibility complex II, MHC II)<sup>[8]</sup>。DC成熟是由活化的T淋巴细胞介导的,推测因sPD-1上调引起的DC成熟可能受到T细胞反应增强的影响。这也从另一个方面说明sPD-1在增强抗原特异性T细胞免疫应答中起辅助作用。但是,有研究<sup>[12]</sup>发现,将DC和T细胞与sPD-1共培养,观察到T细胞增殖和IL-2生成受到抑制,可能当sPD-1与DC中的PD-L1结合时,发生反向信号转导而抑制DC的成熟。(3)sPD-1可能成为潜在的生物标志物。sPD-1对自身免疫性疾病、结核性脑膜炎、先兆子痫、重症脓毒症、感染性休克和艾滋病等疾病具有辅助诊断功能,并且sPD-1对多种肿瘤具有诊断、疗效预测及预后评估的作用。

## 2 sPD-1作为标志物在临床中的应用

### 2.1 sPD-1的检测方法

目前,运用ELISA法检测sPD-1的表达水平大多依赖于单克隆抗体的制备和分离,其成本高、耗时长,且在临床应用中的敏感性和重复性存在局限性。有学者<sup>[13]</sup>开发了一种基于磁微粒化学发光的快速、灵敏的免疫分析系统,该系统具有全自动、可重复性高的特点。利用该系统检测多种肿瘤患者的血清,与健康对照组相比,sPD-1、sPD-L1和sCTLA-4水平均升高,且灵敏度和检测范围足以满足肿瘤术前术后的疗效评估。同时,

基于BD-LSR-Fortessa及Luminex液相芯片技术的8色流式细胞术,利用健康人PBMC进行验证,刺激后的CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞可溶性LAG-3、TIM-3、CTLA-4和PD-1上调,这也是一种检测可溶性免疫检查点分子表达水平的新技术<sup>[14]</sup>。此外,还有一种表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)-微流路芯片平台,该平台利用:(1)纳米酵母的单链可变区片段(single chain variable fragment, scFv)作为单克隆抗体的替代品,具有成本相对较低、制备简单及稳定性高等优点;(2)表面的氧化石墨烯材料,减少了生物功能化的步骤,因此避免了普遍的生物素-链霉亲和素化学结合的模式;(3)微流路芯片平台则利用交流电流体力学诱导的纳米混合效应来增强与目标scFv的结合以减少非特异性结合。利用该平台,人血清中可溶性免疫检查点的检测范围是PD-1(100 fg/ml~1 ng/ml)、PD-L1(50 fg/ml~100 pg/ml)和LAG-3(100 fg/ml~1 ng/ml)<sup>[15]</sup>。

### 2.2 sPD-1在肿瘤诊断中的应用

鉴于sPD-1在免疫调节中的重要作用,sPD-1在肿瘤诊断中具有极其重要的作用。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是异质性最强的恶性肿瘤。利用ELISA法评估32例PDAC患者血清中多种抑制性免疫检查点相关标志物的水平,使用ROC曲线和单变量分析,建立了sPD-1(>8.6 ng/ml)、sPD-L1(>0.36 ng/ml)、sBTLA(>1.91 ng/ml)、sBTN3A1(>6.98 ng/ml)和pan-sBTN3A(>6.92 ng/ml)的血清水平参考值<sup>[16]</sup>。

检测鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)患者在调强放射治疗(intensity modulated radiation therapy, IMRT)前后血清中32种蛋白和细胞因子的表达水平,与健康对照组相比,共有24种蛋白和细胞因子的表达水平具有显著差异,其中sPD-1的表达水平在IMRT治疗前与治疗均显著降低[(12.4±7.8)pg/ml、(30.0±20.6)pg/ml vs (69.7±38.8)pg/ml],但IMRT治疗后血清sPD-1表达水平比治疗前显著升高<sup>[17]</sup>。

检测90例食管鳞癌患者及40例健康对照者外周血中sPD-1、sPD-L1及IFN- $\gamma$ 的表达情况,发现食管鳞癌组血清中sPD-1水平显著高于正常对照组,但手术前后血清中sPD-1水平无明显差异且sPD-1的表达水平与临床病理特征无明显相关,提示sPD-1可作为食管鳞癌诊断的潜在生物标志物<sup>[18]</sup>。

对38例肺腺癌、35例肺鳞癌患者及30例健康体检者外周血sPD-1水平的检测发现,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者外周血sPD-1的表达水平较健康体检者显著上调[肺腺癌(104.98±20.76)、肺鳞癌(109.13±24.65) vs 健康体检者(50.80±14.38)pg/ml],

检测外周血sPD-1表达水平对NSCLC患者病情监测及预后判断有重要意义<sup>[19]</sup>。除此之外,sPD-1还与自身免疫性疾病的进展密切相关,可以辅助诊断早期类风湿性关节炎<sup>[20-21]</sup>、自身免疫性肝炎<sup>[22-23]</sup>、免疫性血小板减少症<sup>[24]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[25-26]</sup>、结核性脑膜炎<sup>[27]</sup>、先兆子痫<sup>[28]</sup>、重症脓毒症、感染性休克<sup>[29]</sup>和艾滋病<sup>[30]</sup>等疾病,并对疾病进展有一定的预测作用。

### 2.3 sPD-1在疗效预测中的应用

在评估sPD-1、sPD-L1、血管内皮生长因子A、可溶性CD40配体(sCD40L)和可溶性CD44(sCD44)与转移性NSCLC患者生存相关性的研究中,sPD-1和sPD-L1的复合生物标志物可用来预测NSCLC患者PD-1单抗纳武单抗(nivolumab)治疗的疗效<sup>[31]</sup>。

在一项转移性黑色素瘤患者的随机试验中,对22例接受肿瘤细胞疫苗(tumor cell vaccine,TCV)治疗的患者和17例接受DC疫苗治疗的患者进行血液样本检测。在接受自体DC疫苗治疗的转移性黑色素瘤患者中,本身sPD-1水平较低或不高,但在3周接种疫苗后sPD-1水平有所下降的两类患者具有较长的生存期。因此sPD-1可作为接受自体DC疫苗治疗的转移性黑色素瘤患者疗效评估的潜在标志物<sup>[32]</sup>。

测定47例晚期食管癌患者血清中sPD-L1、sPD-1、sCD155、sLAG3和sCD226水平,并与24例对照组进行比较。患者治疗前sPD-1和sCD155水平显著高于对照组。sPD-1与淋巴结转移、肿瘤直径较大、血清SCC抗原水平较高者密切相关,因而sPD-1水平可能与食管癌的侵袭性有关<sup>[33]</sup>。

### 2.4 sPD-1在预后评估中的应用

38列表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)突变的NSCLC患者在接受厄洛替尼(erlotinib)治疗的同时,随着肿瘤的进展,sPD-1表达水平较高的患者有着更长的无进展生存期(progression free survival,PFS)和总生存期(overall survival,OS)。但sPD-1水平与T790M耐药突变(TKI治疗NSCLC中最常见的EGFR耐药突变)的发生无关<sup>[34]</sup>。

在乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)感染的患者中,较高的sPD-1水平则预示患者可能从病毒性肝炎进展为肝癌<sup>[35]</sup>。在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B,CHB)患者中,sPD-1可作为评价肝纤维化的新指标,可能有助于提示谷丙转氨酶水平正常的CHB患者抗病毒治疗的效果<sup>[36]</sup>。并且在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)患者中,具有高水平血清sPD-1的患者具有良好的OS,并趋向于延长无病生存期(disease free survival,DFS)<sup>[37]</sup>。

sPD-1不仅可以作为诊断PDAC的潜在标志物<sup>[6]</sup>,同时也可作为生存期预测的指标。PDAC患

者sPD-1(>8.6 ng/ml)、sPD-L1(>0.36 ng/ml)、sBTLA(>1.91 ng/ml)、sBTN3A1(>6.98 ng/ml)和pan-sBTN3A(>6.92 ng/ml)的血清水平参考值在另外27个样本组成的独立验证队列中,可以有效地区分PDAC患者的生存期。因此,监测血清中可溶性抑制性免疫检查点的浓度有助于预测PDAC患者的生存期,从而改善治疗效果<sup>[16]</sup>。

NPC患者IMRT后血清sPD-1浓度与患者生存有关。血清sPD-1水平高的(>10.19 pg/ml, $n=18$ )患者比sPD-1水平低的( $n=19$ , $P=0.021$ )患者有更好的生存率。sPD-1水平高的患者生存时间为(31.0±3.2)个月,sPD-1水平低的患者生存时间为(27.1±10.8)个月。血清sPD-1水平是NPC患者潜在的预后评估标志物<sup>[17]</sup>。

## 3 sPD-1在抗肿瘤治疗中的应用

### 3.1 与其他生物治疗联合应用

根据sPD-1具有与PD-L1/PD-L2结合能力的特点,很多研究将PD-1胞外段即sPD-1与其他免疫治疗相关靶点结合,可以提高免疫治疗的疗效。

CH50是一种纤维结合蛋白的双结构域分子,通过增强巨噬细胞(macrophage, M $\phi$ )的活性来抑制肿瘤的发展。构建sPD-1-CH50分泌型重组肽,发现sPD-1-CH50能增强M $\phi$ 和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)溶解PD-L1<sup>+</sup>肿瘤细胞的活性。这种作用与诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的增加有关。并且,小鼠体内研究表明sPD-1-CH50能抑制肝癌的侵袭和生长<sup>[38]</sup>。

溶瘤病毒是开拓肿瘤联合免疫疗法的新思路,缺乏共刺激信号和负性免疫检查点的调控是目前的瓶颈所在。有研究<sup>[39]</sup>设计了一种表达可溶性融合蛋白的腺病毒,含有PD-1和CD137L的胞外结构域(sPD-1/CD137L-Ad5-PC),保留了CD137L的共刺激活性,能促进活化的CD8<sup>+</sup>T细胞存活和IFN- $\gamma$ 的产生。可显著提高腹水型和皮下移植型HCC小鼠模型的抗肿瘤活性,长期治愈率分别为70%和60%。此外,在人源化重度免疫缺陷小鼠模型NOD-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>mlm</sup>中,表达人sPD-1/CD137L融合蛋白的Ad5-huPC能有效抑制人源化小鼠模型肿瘤生长并提高生存率。因此Ad5-huPC能特异性及系统性的防止肿瘤在原地及远处转移复发,克服溶瘤病毒免疫治疗时缺乏共刺激信号和负性免疫检查点调控的缺陷。

人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus-1,HIV-1)感染者必须通过终生接受抗逆转录病毒药物治疗以控制感染。有研究<sup>[40]</sup>开发一种增强抗病毒T细胞反应的治疗性DC疫苗,可在不使用抗逆

转录病毒药物的情况下控制病毒载量。HIV-1 抗原与 CD40L 和可溶性、高亲和力的 PD-1 二聚体共同表达于慢病毒载体上, CD40L 激活 DC, sPD-1 结合 PD-L1 以阻止检查点激活并增强 CTL 的杀伤效应。与对照组相比, 引入 sPD-1 可加速抗病毒反应, 提高抗病毒疫苗的免疫疗效。

### 3.2 与抗肿瘤疫苗联合应用

肿瘤疫苗是将肿瘤抗原以多种形式如: 肿瘤细胞、肿瘤相关蛋白或多肽、表达肿瘤抗原的基因等导入患者体内, 以增强免疫原性, 激活患者自身的免疫系统, 诱导机体细胞免疫和体液免疫应答, 从而达到控制或清除肿瘤的目的。sPD-1 与抗肿瘤疫苗的联合则通过克服肿瘤引起的免疫抑制状态, 达到增强免疫治疗疗效的目的。

热激蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 疫苗可诱导 T 细胞浸润到黑色素瘤病灶内部, 并诱导 IFN- $\gamma$  和 IL-2 的表达, 延缓黑色素瘤的肺转移, 但最终还是发生了疾病进展。究其原因, HSP70 疫苗治疗的耐药性与残留肿瘤细胞表达的 PD-L1 有关。通过静脉注射 pPD-1A (一种编码 PD-1 胞外结构域的质粒) 阻断 PD-L1, 发现可以逆转这种耐药性, 提高疗效。进一步研究发现 HSP70 疫苗联合 sPD-1 治疗的小鼠体内 Th1 细胞分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-2 增加, 负性分子 IL-10、TGF- $\beta$  和 Foxp3 降低。并且将治疗频率降低至每周 1 次后, 仍能产生显著的抗肿瘤作用。结果表明, sPD-1 可逆转 HSP70 疫苗治疗肿瘤的耐药性, 增强免疫治疗疗效并为肿瘤免疫治疗提供了新思路<sup>[9]</sup>。

4-1BB 是 T 细胞表面共刺激分子, 但其属于激活分子, 4-1BB 与其配体 (4-1BBL) 相互作用, 激活 T 细胞发挥功能。利用共刺激分子 4-1BBL 与 sPD-1 联合应用能下调 IL-10 和 TGF- $\beta$ , 上调 IL-2 和 IFN- $\gamma$ , 增加 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润, 建立有效的抗肿瘤免疫微环境。4-1BBL/sPD-1 联合治疗可以使有少量肝癌 H22 细胞的小鼠或者 60% 的有大量肝癌 H22 细胞的小鼠体内的肿瘤细胞被清除<sup>[41]</sup>。

sPD-1、sTim-3 与腺病毒载体-猿猴免疫缺乏病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 疫苗 (rAd5-SIV) 联合应用可增强小鼠 T 细胞增殖能力, 并产生更多抗原特异性的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 增强 rAd5-SIV 诱导的细胞免疫应答, 可用于提高 SIV/HIV 疫苗治疗 HIV 的效果<sup>[42]</sup>。

在三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 疫苗研究的过程中, 开发了表达 sPD-1 的衰老细胞疫苗 (STCV/sPD-1), 其在体外表现出生长周期阻滞并分泌大量细胞因子的活跃状态, 在体内则吸引了更多的成熟 DC 及更少的耗竭性 PD-1<sup>+</sup> T 细胞,

并且与对照组相比具有更好的安全性和有效性。因此 STCV/sPD-1 能有效地诱导机体产生较强的抗肿瘤免疫应答, 可延缓肿瘤的发生并抑制肿瘤的早期进展, 是一种潜在的 TNBC 预防策略<sup>[43]</sup>。

### 3.3 与 CAR-T 细胞治疗联合应用

嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 免疫疗法在恶性血液病患者中取得了良好的疗效, 但在免疫抑制分子高表达的实体瘤治疗中的疗效欠佳。有研究将 CAR-T 改造成能分泌 sPD-1 的 CD19 CAR-T, 与经典的二代 CAR-T 相比, 分泌 sPD-1 的 CD19 CAR-T 可以提高其杀伤肿瘤细胞的效率。重度免疫缺陷小鼠 (NOD-SCID IL2rg<sup>-/-</sup>, NSG) 尾静脉注射 NALM-6-PD-L1 细胞构建荷瘤模型, 与经典的二代 CAR-T 相比, 分泌 sPD-1 的 CD19 CAR-T 能更加有效地控制小鼠的肿瘤负荷, 延长荷瘤小鼠的生存期。且 sPD-1 可以改善 CAR-T 的分化状态, 增强其氧化磷酸化水平和抗凋亡的能力<sup>[44]</sup>。还有研究<sup>[45]</sup>将 PD-1 胞外结构域和 IgG4 中 CH3 组成的融合蛋白引入靶向 GPC3 的 CAR-T (GPC3-28Z-sPD-1 CAR-T), 能特异性识别杀伤 GPC3<sup>+</sup> HCC 细胞并阻断 PD-1/PD-L1 通路。sPD-1 的共表达使得 GPC3-28Z-sPD-1 CAR-T 增殖能力显著提高, 并保护 CAR-T 在与靶细胞共孵育时免于耗竭。在两种 HCC 移植瘤模型中, GPC3-28Z-sPD-1 CAR-T 抑瘤能力显著增强, 荷瘤小鼠外周血及肿瘤组织中 CD3<sup>+</sup> T 细胞数量增加、颗粒酶 B 水平升高、Ki67 表达水平降低。因此, sPD-1 的加入有可能增强 GPC3 特异性 CAR-T 治疗 HCC 患者的免疫疗效。

### 3.4 与细胞因子联合应用

sPD-1 增强免疫疗效的能力还可以体现在其与细胞因子联合治疗方面。sPD-1 联合 IL-21 可显著抑制肝癌 H22 细胞小鼠移植瘤的生长。与单独应用 IL-21 和 sPD-1 相比, 联合应用可增强抗肿瘤免疫应答, 提高 CTL 毒性, 增加脾 CTL 和 NK 细胞的数量, 上调细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-2、下调 IL-10 的表达。因此, IL-21 联合 sPD-1 免疫治疗可诱导更有效的抗肿瘤免疫反应, 这可能具有较好的临床应用价值<sup>[46]</sup>。

## 4 展 望

mRNA 前体通过内含子不切割、5'或 3'剪切点竞争、外显子跳过、外显子互斥等方式, 可以获得不同的成熟 mRNA, 即可形成不同的转录剪接体。可变剪接是生物多样性的重要成因, 也是 PD-1 多样性的重要成因。由于选择了不同的外显子, 导致编码蛋白质的不同, 产生多种功能相近或者迥异的变体, 甚至还会出现蛋白质编码提前终止, 起到分子开关的作用。sPD-1 作为液体活检的生物标志物具有良好的应用前景。通过无创检

测可应用于肿瘤的早期筛查、诊断、用药指导、疗效评估、病程监测及预后管理,此外还可监管自身免疫性疾病等其他疾病。其优势在于能够反映病灶的综合信息,可以进行高频率监测,指导临床准确用药,并可以显著降低成本、降低患者风险。sPD-1通过与抗肿瘤疫苗、CAR-T细胞治疗、细胞因子治疗及其他生物治疗手段联合应用,可以增强其抗肿瘤免疫治疗的疗效,但迫切需要通过更多的临床试验来验证及推动。

### [参考文献]

- [1] SUN C, MEZZADRA R, SCHUMACHER T N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. *Immunity*, 2018, 48(3): 434-452. DOI:10.1016/j.immuni.2018.03.014.
- [2] NIELSEN C, OHM-LAURSEN L, BARINGTON T, et al. Alternative splice variants of the human PD-1 gene[J]. *Cell Immunol*, 2005, 235(2): 109-116. DOI:10.1016/j.cellimm.2005.07.007.
- [3] FINGER L R, PU J, WASSERMAN R, et al. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors[J]. *Gene*, 1997, 197(1/2): 177-187. DOI:10.1016/s0378-1119(97)00260-6.
- [4] GU D Q, AO X, YANG Y, et al. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 132[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6260693/>. DOI:10.1186/s40425-018-0449-0.
- [5] ZHU X X, LANG J H. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 97671-97682[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5722594/>. DOI:10.18632/oncotarget.18311.
- [6] CHEN Y J, WANG Q, SHI B M, et al. Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1<sup>+</sup> cell lines[J]. *Cytokine*, 2011, 56(2): 231-238. DOI:10.1016/j.cyto.2011.06.004.
- [7] MOHAMMADZADEH S, KHANAHMAD H, ESMAEIL N, et al. Producing soluble human programmed cell death protein-1: a natural supporter for CD4<sup>+</sup> T cell cytotoxicity and tumor cells apoptosis[J/OL]. *Iran J Biotechnol*, 2019, 17(4): e2104[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7357696/>. DOI:10.30498/IJB.2019.85180.
- [8] SONG M Y, PARK S H, NAM H J, et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1[J]. *J Immunother*, 2011, 34(3): 297-306. DOI:10.1097/CJI.0b013e318210ed0e.
- [9] GENG H, ZHANG G M, XIAO H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(11): 2657-2664. DOI:10.1002/ijc.21795.
- [10] ELHAG O A, HU X J, WEN-YING Z, et al. Reconstructed adeno-associated virus with the extracellular domain of murine PD-1 induces antitumor immunity[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 4031-4036. DOI:10.7314/apjcp.2012.13.8.4031.
- [11] SHIN S P, SEO H H, SHIN J H, et al. Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response[J/OL]. *Mol Ther*, 2013, 21(3): 688-695[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589170/>. DOI:10.1038/mt.2012.252.
- [12] KUIPERS H, MUSKENS F, WILLART M, et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell activation[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(9): 2472-2482. DOI:10.1002/eji.200635978.
- [13] GOTO M, CHAMOTO K, HIGUCHI K, et al. Analytical performance of a new automated chemiluminescent magnetic immunoassays for soluble PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in human plasma[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10144[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626008/>. DOI:10.1038/s41598-019-46548-3.
- [14] CUNNINGHAM R A, HOLLAND M, MCWILLIAMS E, et al. Detection of clinically relevant immune checkpoint markers by multicolor flow cytometry[J/OL]. *J Biol Methods*, 2019, 6(2): e114[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6706095/>. DOI:10.14440/jbm.2019.283.
- [15] REZA K K, SINA A A, WUETHRICH A, et al. A SERS microfluidic platform for targeting multiple soluble immune checkpoints[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 126: 178-186. DOI:10.1016/j.bios.2018.10.044.
- [16] BIAN B, FANALE D, DUSETTI N, et al. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(4): e1561120[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422385/>. DOI:10.1080/2162402X.2018.1561120.
- [17] RUAN Y Y, HU W, LI W H, et al. Analysis of plasma EBV-DNA and soluble checkpoint proteins in nasopharyngeal carcinoma patients after definitive intensity-modulated radiotherapy[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3939720[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6525834/>. DOI:10.1155/2019/3939720.
- [18] 郝贺, 李幸, 郭晓金, 等. 食管鳞状细胞癌患者外周血PD-1和PD-L1的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(10): 1118-1123. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2017.10.013.
- [19] 周莉, 张冠男, 王琳, 等. 非小细胞肺癌患者外周血PD-1表达水平及淋巴细胞亚群分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(3): 413-415. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2016.03.021.
- [20] GREISEN S R, RASMUSSEN T K, STENGAARD-PEDERSEN K, et al. Increased soluble programmed death-1 (sPD-1) is associated with disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2014, 43(2): 101-108. DOI:10.3109/03009742.2013.823517.
- [21] WANG X Z, YANG C S, XU F, et al. Imbalance of circulating Tfr/Tfh ratio in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Med*, 2019, 19(1): 55-64. DOI:10.1007/s10238-018-0530-5.
- [22] AARSLEV K, DIGE A, GREISEN S R, et al. Soluble programmed death-1 levels are associated with disease activity and treatment response in patients with autoimmune hepatitis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2017, 52(1): 93-99. DOI:10.1080/00365521.2016.1233576.
- [23] HADLEY T, GILLESPIE S, ESPINOZA H, et al. Soluble PD1 levels are increased with disease activity in paediatric onset autoimmune hepatitis and inflammatory bowel disease[J]. *Autoimmunity*, 2020, 53(5): 253-260. DOI:10.1080/08916934.2020.1755964.
- [24] WANG Y Y, PANG N N, WANG X Y, et al. Percentages of PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and PD-L1<sup>+</sup>DCs are increased and sPD-1 level is elevated in patients with immune thrombocytopenia[J/OL]. *Hum Vaccin*

- Immunother, 2018, 14(4): 832-838[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893189/>. DOI: 10.1080/21645515.2017.1342913.
- [25] DU Y, NIE L Y, XU L, et al. Serum levels of soluble programmed death-1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1(sPD-L1) in systemic lupus erythematosus: Association with activity and severity[J]. *Scand J Immunol*, 2020, 92(1): e12884. DOI:10.1111/sji.12884.
- [26] HIRAHARA S, KATSUMATA Y, KAWASUMI H, et al. Serum levels of soluble programmed cell death protein 1 and soluble programmed cell death protein ligand 2 are increased in systemic lupus erythematosus and associated with the disease activity[J]. *Lupus*, 2020, 29(7): 686-696. DOI:10.1177/0961203320916517.
- [27] KWON J S, PARK J H, KIM J Y, et al. Diagnostic usefulness of cytokine and chemokine levels in the cerebrospinal fluid of patients with suspected tuberculous meningitis[J/OL]. *Am J Trop Med Hyg*, 2019, 101(2): 343-349[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6685561/>. DOI:10.4269/ajtmh.18-0947.
- [28] GU Y, MORGAN J, LEWIS D F, et al. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2020, 83(1): e13193. DOI:10.1111/aji.13193.
- [29] ZHAO Y Z, JIA Y M, LI C S, et al. Predictive value of soluble programmed death-1 for severe sepsis and septic shock during the first week in an intensive care unit[J]. *Shock*, 2019, 51(3): 289-297. DOI:10.1097/SHK.0000000000001171.
- [30] ZILBER E, MARTIN G E, WILLBERG C B, et al. Soluble plasma programmed death 1 (PD-1) and Tim-3 in primary HIV infection[J]. *AIDS*, 2019, 33(7): 1253-1256. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002165.
- [31] TIAKO MEYO M, JOUINOT A, GIROUX-LEPRIEUR E, et al. Predictive value of soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 ligand and CD44 for nivolumab therapy in advanced non-small cell lung cancer: a case-control study[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): E473[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072584/>. DOI:10.3390/cancers12020473.
- [32] DILLMAN R O, NISTOR G I, MCLELLAND B T, et al. Preliminary observations on soluble programmed cell death protein-1 as a prognostic and predictive biomarker in patients with metastatic melanoma treated with patient-specific autologous vaccines[J/OL]. *Oncotarget*, 2019, 10(51): 5359-5371[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6731107/>. DOI:10.18632/oncotarget.27164.
- [33] YOSHIDA J, ISHIKAWA T, DOI T, et al. Clinical significance of soluble forms of immune checkpoint molecules in advanced esophageal cancer[J]. *Med Oncol*, 2019, 36(7): 60. DOI: 10.1007/s12032-019-1285-x.
- [34] SORENSEN S F, DEMUTH C, WEBER B, et al. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib[J]. *Lung Cancer*, 2016, 100: 77-84. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.08.001.
- [35] CHENG H Y, KANG P J, CHUANG Y H, et al. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e95870[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245192/>. DOI:10.1371/journal.pone.0095870.
- [36] ZHOU L, LI X Y, HUANG X H, et al. Soluble programmed death-1 is a useful indicator for inflammatory and fibrosis severity in chronic hepatitis B[J/OL]. *J Viral Hepat*, 2019, 26(7): 795-802[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6849537/>. DOI: 10.1111/jvh.13055.
- [37] CHANG B Y, HUANG T, WEI H J, et al. The correlation and prognostic value of serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3): 353-363[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6426820/>. DOI:10.1007/s00262-018-2271-4.
- [38] QIU H, LIU S P, XIE C H, et al. Regulating immunity and inhibiting tumor growth by the recombinant peptide sPD-1-CH50 [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(12): 5089-5094.
- [39] ZHANG Y H, ZHANG H L, WEI M, et al. Recombinant adenovirus expressing a soluble fusion protein PD-1/CD137L subverts the suppression of CD8<sup>+</sup> T cells in HCC[J/OL]. *Mol Ther*, 2019, 27(11): 1906-1918[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6838906/>. DOI:10.1016/j.ymthe.2019.07.019.
- [40] NORTON T D, ZHEN A J, TADA T, et al. Lentiviral vector-based dendritic cell vaccine suppresses HIV replication in humanized mice [J/OL]. *Mol Ther*, 2019, 27(5): 960-973[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520467/>. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.03.008.
- [41] XIAO H, HUANG B, YUAN Y, et al. Soluble PD-1 facilitates 4-1BBL-triggered antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1823-1830. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-06-2154.
- [42] XIAO L J, WANG D M, SUN C J, et al. Enhancement of SIV-specific cell mediated immune responses by co-administration of soluble PD-1 and Tim-3 as molecular adjuvants in mice[J/OL]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(3): 724-733[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130272/>. DOI:10.4161/hv.27340.
- [43] CHEN Z H, HU K, FENG L T, et al. Senescent cells re-engineered to express soluble programmed death receptor-1 for inhibiting programmed death receptor-1/programmed death ligand-1 as a vaccination approach against breast cancer[J/OL]. *Cancer Sci*, 2018, 109(6): 1753-1763[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5989746/>. DOI:10.1111/cas.13618.
- [44] ZHANG A, SUN Y, WANG S Y, et al. Secretion of human soluble programmed cell death protein 1 by chimeric antigen receptor-modified T cells enhances anti-tumor efficacy[J]. *Cytotherapy*, 2020, 22(12): 734-743. DOI:10.1016/j.jcyt.2020.05.007.
- [45] PAN Z Y, DI S M, SHI B Z, et al. Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10): 1621-1634. DOI: 10.1007/s00262-018-2221-1.
- [46] PAN X C, LI L, MAO J J, et al. Synergistic effects of soluble PD-1 and IL-21 on antitumor immunity against H22 murine hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 90-96[2020-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525477/>. DOI: 10.3892/ol.2012.966.

[收稿日期] 2020-11-12

[修回日期] 2021-05-30

[本文编辑] 党瑞山