

网络出版时间:2023-10-08 15:43:41 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1226.004

靶向骨肉瘤 PD-1/PD-L1 信号通路探针的实验研究

黄海峰¹, 邹欢², 王炼¹, 杨先腾¹, 朱华³, 李姗姗⁴

摘要 目的 探讨筛选程序性死亡受体-1 (PD-1)/程序性死亡受体配体-1 (PD-L1) 信号通路表达阳性的骨肉瘤患者的无创检测手段。方法 通过瘤块成瘤方法建立人骨肉瘤细胞(OS-732)皮下荷瘤鼠动物模型,毒性试验验证 PD-L1 抗体对小鼠脏器的毒性,进一步合成¹²⁴I-anti-PD-L1 单克隆抗体分子探针,在 OS-732 荷瘤鼠尾静脉注射 18.5 MBq ¹²⁴I-anti-PD-L1 探针开始进行 OS-732 骨肉瘤的微型正电子发射断层显像/计算机断层成像(Micro-PET/CT)显像。结果 OS-732 骨肉瘤模型成功构建,免疫组化显示 OS-732 骨肉瘤存在 PD-L1 蛋白的表达, Micro-PET/CT 在不同的时间点(注射探针后 2, 24, 48 h)成功显像 OS-732 骨肉瘤,实现对骨肉瘤 PD-L1 的无创实时观测。结论 ¹²⁴I-anti-PD-L1 单克隆抗体分子探针可以成功靶向 OS-732 骨肉瘤的 PD-L1 受体,并呈现清晰的免疫成像,从而实现无创筛选 PD-L1 阳性表达的

骨肉瘤患者。

关键词 骨肉瘤; PD-1; PD-L1; PET/CT; 单克隆抗体; 免疫检查点

中图分类号 R 730.51; R 445.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1823-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.004

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,研究^[1]表明,合并肺部转移的骨肉瘤患者的 1、2、5 年生存率逐年下降(93.3% ~ 11.5%)。免疫治疗可能是骨肉瘤治疗的新希望,因此,阻断骨肉瘤患者的程序性死亡受体-1/程序性死亡受体配体-1(programmed death receptor-1 /programmed death receptor ligand-1, PD-1/PD-L1)信号通路可以作为治疗骨肉瘤患者的重要策略。PD-L1 单抗特异性作用于肿瘤细胞表面的 PD-L1 蛋白受体,从而阻碍 T 细胞上的 PD-1 受体与肿瘤细胞表面的 PD-L1 配体结合,进一步起到抑制 T 细胞免疫逃逸的功能。恶性肿瘤患者的 PD-1/PD-L1 的表达水平与免疫治疗的作用呈正相关,与预后呈负相关,因此,抗 PD-L1 单克隆抗体可以逆转 PD-1/PD-L1 免疫检查点对 T 细胞应答的阻断作用。用于治疗恶性肿瘤的 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂已经被视为肿瘤学的一项革命性创新^[2]。PD-L1 是在恶性肿瘤细胞膜上高度表达的跨膜蛋

2023-06-19 接收

基金项目:贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]一般 471)

作者单位:贵州省人民医院¹ 骨科、⁴ 麻醉科,贵阳 550002

² 贵州省职工医院康复医学科,贵阳 550025

³ 北京大学肿瘤医院核医学部肿瘤发生与转化研究教育部重点实验室(北京),放射性药物研究与评价重点实验室(国家药品监督管理局),北京 100142

作者简介:黄海峰,男,副主任医师;

李姗姗,女,硕士,主治医师,责任作者, E-mail:422389344@qq.com

The study included 151 patients with knee OA, a general questionnaire survey was conducted, and the knee structural was photographed by magnetic resonance imaging (MRI). The cartilage volume was measured by OsiriX software in 3D-FLASH sequence, and cartilage defect and BML were determined in T2-weighted sequence. Serum IL-18 and matrix metalloproteinase (MMP)-3, 13 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). SPSS software was used for statistical analysis. **Results** In multivariable analyses, serum IL-18 level was negatively associated with total cartilage volume ($\beta = -0.24$, 95% CI: $-0.13 - 0.03$) and the association was consistent at divided part of joint (femorotibial joint and the patella femoral joint, all $P < 0.05$). Serum IL-18 level was positively associated with cartilage defect and BML at media femorotibial area (all $P < 0.01$). Serum IL-18 level was positively associated with MMP-3 ($\beta = 0.31$, 95% CI: $0.001 - 0.010$) and MMP-13 ($\beta = 0.86$, 95% CI: $0.08 - 0.10$, all $P < 0.01$). **Conclusion** Serum IL-18 level is negatively associated with cartilage volume and positively associated with cartilage defect, BML, MMP-3 and MMP-13, suggesting IL-18 may play a significant role in the progression of cartilage degradation in patients with knee OA, the therapy of targeting serum IL-18 may reduce the injury of article cartilage in patients with knee OA and delay the progression of disease.

Key words osteoarthritis; interleukin-18; cartilage defect; bone marrow lesion; matrix metalloproteinase

白^[3]。已经有研究^[4]表明,PD-L1 过表达预示恶性肿瘤愈后不佳,但接受 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗的恶性肿瘤患者生存期会更长。该研究报道了靶向 PD-L1 的¹²⁴I-anti-PD-L1 单克隆抗体分子探针的成功合成,并进一步通过微型正电子发射断层显像/计算机断层成像(micro positron emission tomography/ computed tomography, Micro-PET/CT)实时评估了 OS-732 骨肉瘤小鼠模型中的 PD-L1 受体蛋白表达的状态。

1 材料与方法

1.1 主要实验瘤株及实验动物 OS-732 皮下荷瘤鼠:中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所。18~20 g BALB/c 裸鼠,5~6 周龄,SPF 级(无特定病原体),雌性;北京维通利华实验动物技术有限公司。18~20 g KM 小鼠,5~6 周龄,SPF 级(无特定病原体),雌性;北京华阜康生物科技股份有限公司

1.2 主要试剂 同位素¹²⁴I-I2 和 anti-PD-L1 抗体由北京大学肿瘤医院核医学科提供;PD-L1 抗体(TA809809S,美国 Origene 公司);二抗:山羊抗兔 IgG/HRP 聚合物(PV-6002,北京中杉金桥生物公司)。

1.3 方法

1.3.1 Anti-PD-L1 抗体毒性实验 PBS 组(对照组)及 anti-PD-L1 组(给药组)各 5 只 KM 小鼠(随机分组),小鼠尾静脉分别注射 50 μ g anti-PD-L1 或者同体积 PBS,每周 2 次,连续 4 周。每周 2 次称取小鼠体质量,第 8 次给药后 6 d,即 31 d 后处死小鼠,取肝、脑、肺、肾组织,行 HE 染色;组织学层面确定肝、脑、肺、肾有无损伤。所有动物摘眼球取血,分离血清,测定肌酐(creatinine,CREA)、尿素(urea,U-REA)、谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)及谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST),在生化指标层面确定有无肝肾损伤。

1.3.2 皮下荷瘤鼠动物模型的建立 正常饲养待 OS-732 皮下荷瘤鼠皮下肿瘤生长直径达 1 cm 时处死,选择生长良好的肿瘤组织,用手术刀将肿瘤组织切割成 3~4 mm³ 大小的组织块,以特制的组织接种器将肿瘤组织移植到 BALB/c 裸鼠右侧腋窝皮下,待 OS-732 皮下荷瘤鼠肿瘤直径达到 0.8~1.0 cm 后再进行体内实验。所有动物实验均符合医院动物管理和使用委员会的相关指导方针(贵州省人民医院伦理委员会批准号:2020384 号)。

1.3.3 PD-L1 的免疫组化染色 取 OS-732 皮下荷

瘤鼠的肿瘤组织行免疫组化染色。石蜡切片脱蜡处理,组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,加一抗二抗,DAB 显色,复染细胞核,脱水封片,苏木精染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。

1.3.4 ¹²⁴I-anti-PD-L1 单克隆分子探针的制备 在 1.5 ml EP 管中依次加入 20 μ l anti-PD-L1 (5 mg/ml)、200 μ l PB (0.1 mol/L、pH 7.0) 溶液和 250 μ l 含 74 MBq ¹²⁴I-I2 的溶液,而后加入 12 μ l (1 mg/ml) NBS 反应 60 s,再向其中加入 200 μ l 10% HSA 终止反应,最后 PD-10 脱盐柱纯化产物。

1.3.5 Micro-PET/CT 骨肉瘤 PD-L1 的成像 通过喂食 0.5% KI 溶液阻断荷 OS-732 骨肉瘤裸鼠甲状腺对碘的摄取,时间点为注射分子探针前 3 天。3 只荷 OS-732 骨肉瘤的裸鼠尾静脉注射 18.5 MBq ¹²⁴I-anti-PD-L1 单克隆分子探针,并在注射探针后的相应时间点(注射探针后 2、24、48 h)进行 Micro-PET/CT 骨肉瘤 PD-L1 成像。

1.4 统计学处理 结果分析采用 $\bar{x} \pm s$,经 Graph-Pad Prism 5.0 软件作图,采用 IBM SPSS 23.0 统计学软件行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Anti-PD-L1 抗体毒性试验

2.1.1 动物体质量变化 所有 KM 小鼠在给药期间活动、进食等一般状态良好,体质量均有一定程度的上升。首次给药当天记为 D0,第 8 次给药后 6 d,即 D31,anti-PD-L1 抗体组的动物体质量与 PBS 组相比差异无统计学意义($t = -5.8, P = 0.58$)。所有动物体质量变化情况见图 1。

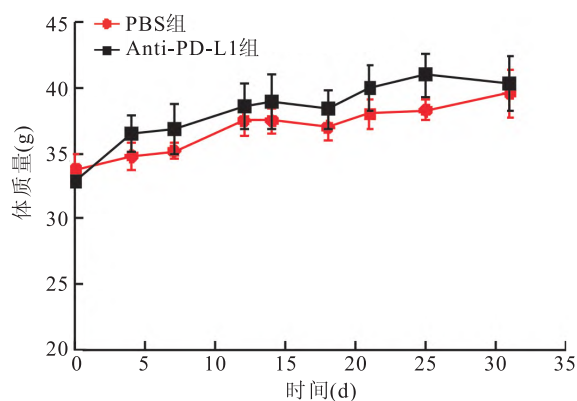


图1 给药后 KM 小鼠体质量变化趋势图

2.1.2 HE 结果 第8次给药后6 d,即D31,每组取3只动物的肝、脑、肺、肾4个组织,苏木精-伊红染色检测组织的病变情况,结果显示PBS组与anti-PD-L1组均无明显病变,典型HE染色结果见图2,其中肝(图2A、B):两组肝小叶结构正常,肝细胞索排列整齐,肝小窦结构清晰,均未见炎性细胞浸润及细胞变性坏死。脑(图2C、D):两组神经元染色成椭圆形或圆形,数量丰富,均排列规则致密,基质丰富,染色均匀。肺(图2E、F):两组肺泡大小均匀,结构正常,均未见肉芽肿等明显增生,未见炎性细胞浸润及细胞变性坏死。肾(图2G、H):两组肾小球均匀分散在皮质内,结构完整,均未见明显病变;髓质内小管均未见明显病变。

2.1.3 生化指标结果 第8次给药后6 d,即D31,分别取PBS组与anti-PD-L1组KM小鼠外周血分离血清,比色法检测血清中CREA、UREA、ALT及AST的含量。结果显示,anti-PD-L1组KM小鼠各指标与PBS组差异无统计学意义。见表1。

2.2 荷瘤鼠骨肉瘤 PD-L1 的免疫组化染色 OS-732 骨肉瘤荷瘤鼠动物模型成功构建(图3A),同时免疫组化染色(immunohistochemistry,IHC)证实骨肉瘤组织细胞膜表面的PD-L1受体蛋白表达为阳性,即PD-L1受体免疫组化染色为棕色(图3E)。

2.3 PD-L1 的 Micro-PET/CT 显像 OS-732 骨肉瘤荷瘤鼠在尾静脉注射18.5 MBq ^{124}I -anti-PD-L1 单

克隆分子探针2 h后开始进行Micro-PET/CT肿瘤显像。根据肿瘤成像,可以看到在荷瘤鼠肿瘤部位没有明显的摄取,肿瘤区域未出现显像,分子探针主要聚集在荷瘤鼠的心脏和肝脏中(图3B)。当Micro-PET/CT成像在注射后24 h时,在骨肉瘤部位可以观察到明显的探针摄取,肿瘤区域已经出现了清晰的成像(图3C)。探针注射后48 h,荷瘤鼠肝脏中的残留探针基本被代谢完毕,骨肉瘤部位表现明显的高摄取(图3D),整个肿瘤成像清晰。

3 讨论

PD-L1的肿瘤成像是一个热门研究方向^[5-6],与免疫有关的成像主要包括SPECT、PET、光学成像和MRI。每种成像方法在展示肿瘤形态和生理方面都有其固有的优缺点。该研究表明 ^{124}I -anti-PD-L1单克隆分子探针可用于体内行靶向PD-L1受体蛋白的无创PET成像。

该研究通过毒性实验验证anti-PD-L1对动物无明显毒性,还通过免疫组化实验验证了PD-L1蛋白受体在OS-732肿瘤组织中的表达,并为进一步的成像实验准备了可靠的肿瘤动物模型。骨肉瘤荷瘤鼠通过尾静脉注射 ^{124}I -anti-PD-L1分子探针24 h后,肿瘤部位出现了良好的成像,这样也就可以实现对肿瘤的PD-L1受体的无创实时监测,这种非侵入性成像具有简便快捷,而且精准度高的优点。

表1 anti-PD-L1 给药后KM小鼠各指标的变化情况($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	CREA($\mu\text{mol/L}$)	UREA(mmL/L)
PBS	60.126 $\pm$ 17.556	139.039 $\pm$ 24.289	38.211 $\pm$ 1.945	8.844 $\pm$ 1.505
anti-PD-L1	46.938 $\pm$ 3.851	121.481 $\pm$ 33.896	42.736 $\pm$ 4.973	7.381 $\pm$ 1.149
<i>t</i> 值	1.455	0.909	-1.718	1.599
<i>P</i> 值	0.189	0.394	0.166	0.154

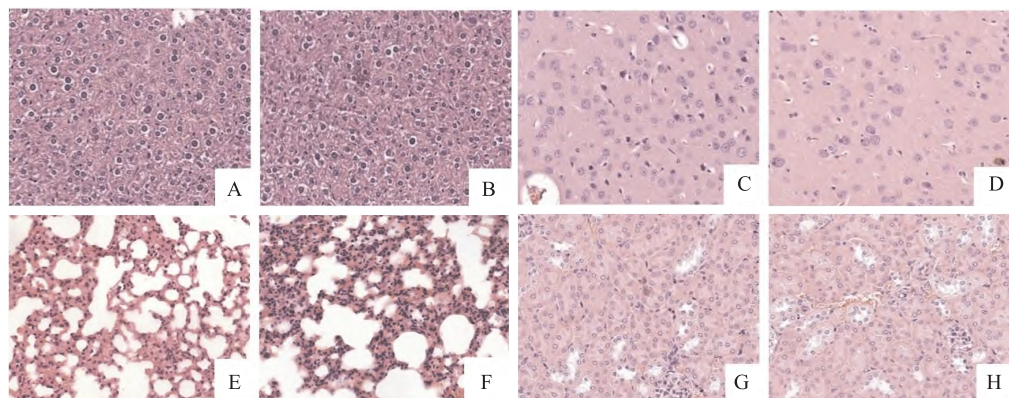


图2 HE染色结果图 $\times 100$

A、C、E、G:PBS组;B、D、F、H:anti-PD-L1组

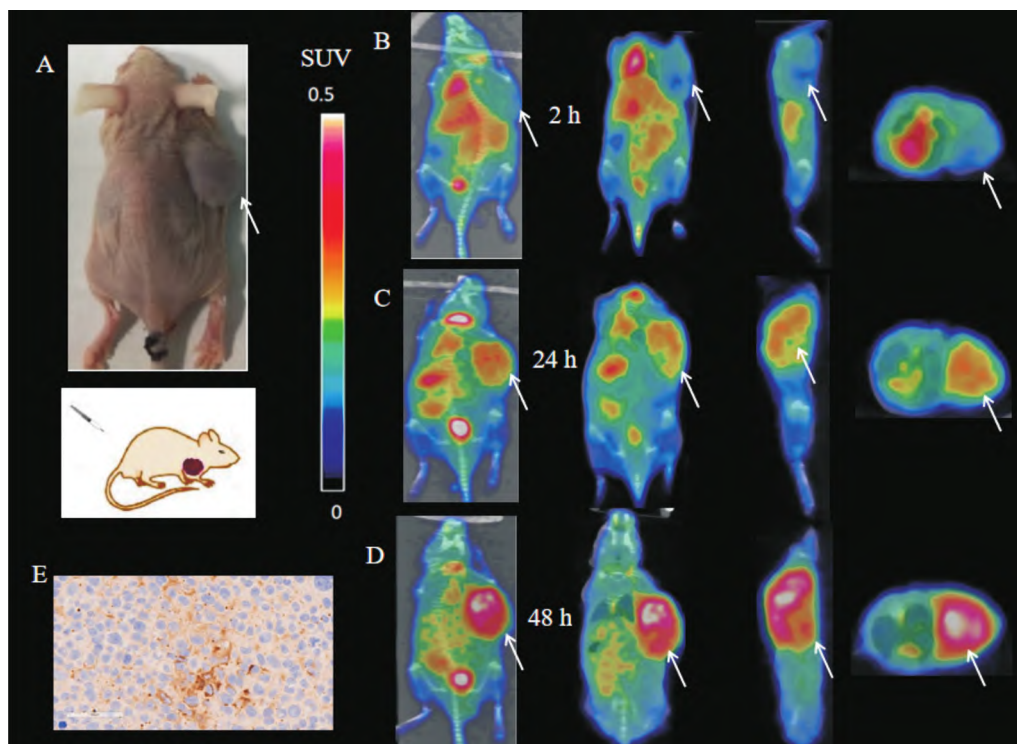


图3 OS-732骨肉瘤的Micro-PET/CT显像及IHC染色

A:骨肉瘤荷瘤鼠模型(肿瘤位于右侧腋下);B:PD-L1分子探针通过尾静脉注射2 h后(从左到右,分别是裸鼠肿瘤的冠状、矢状和水平位图,白色箭头指向OS-732骨肉瘤);C:PD-L1分子探针通过尾静脉注射24 h后;D:PD-L1分子探针通过尾静脉注射48 h后;E:OS-732骨肉瘤组织中PD-L1受体的IHC染色 $\times 200$

目前用于检测肿瘤组织中PD-L1表达的传统方法都是侵入性的,例如IHC或Western blot。另外,当获取肿瘤标本时,存在医源性肿瘤播散的风险。Kim et al^[7]研究表明PD-L1受体蛋白在肿瘤中的存在,而PD-1蛋白主要在肿瘤浸润的淋巴细胞中表达。大多数免疫疗法的基本机制是激活免疫效应物,例如T细胞和自然杀伤细胞。但是,免疫检查点抑制剂,例如PD-1、PD-L1和细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4),它们均能抑制T细胞的功能并促进免疫逃逸。纳武利尤单抗(nivolumab)是一种抗PD-1/PD-L1检查点抑制剂,但是只有在15%~24%的患者中有效,可能与患者体内相关受体蛋白表达量少有关。目前还没有发现包括PD-L1在内的并经过验证的能够准确识别的可能对免疫检查点疗法产生反应患者的生物标志物^[8]。抗PD-L1治疗仅对某些患者有益。PD-1/PD-L1能够抑制抗肿瘤免疫力,因此,在临床环境中阻断PD-L1受体蛋白可能会导致一部分患者发生强烈的抗肿瘤反应^[9]。服用抗PD-L1药物后的患者,在常规治疗后

会得到更好的无进展生存期^[10]。

综上所述,PD-L1的非侵入性成像意义重大,因为免疫疗法在PD-L1阳性患者中更有效,筛选具有潜在PD-L1表达的肿瘤患者可进一步帮助患者的免疫治疗。此外,这项研究采用核医学技术对患者的PD-L1受体蛋白表达进行无创筛查提供了新的探针,有望提高患者对PD-L1免疫治疗的反应率。该研究表明,¹²⁴I-anti-PD-L1分子探针可能为广大骨肉瘤患者选择PD-L1免疫治疗提供新的策略,同时也将为该课题组进一步的免疫治疗研究奠定基础。

参考文献

- [1] 任娟,徐叶峰,匡唐洪,等.104例骨肉瘤肺转移患者的预后及其影响因素[J].中华肿瘤杂志,2017,39(4):263-8.
- [2] Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells[J]. Oncotarget, 2017,8(31):51936-45.
- [3] Kalim M, Chen J, Wang S, et al. Construction of high level prokaryotic expression and purification system of PD-L1 extracellular domain by using Escherichia coli host cell machinery[J]. Immunol Lett, 2017,190:34-41.
- [4] Aguiar P N Jr, De Mello R A, Hall P, et al. PD-L1 expression as

- a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: updated survival data[J]. *Immunotherapy*, 2017,9(6):499 – 506.
- [5] Broos K, Lecocq Q, Raes G, et al. Noninvasive imaging of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint; embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy [J]. *Theranostics*, 2018,8(13):3559 – 70.
- [6] Du Y, Jin Y, Sun W, et al. Advances in molecular imaging of immune checkpoint targets in malignancies; current and future prospect[J]. *Eur Radiol*, 2019,29(8):4294 – 302.
- [7] Kim J R, Moon Y J, Kwon K S, et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas[J]. *PLoS One*, 2013,8(12):e82870.
- [8] Teo M Y, Rosenberg J E. Nivolumab for the treatment of urothelial cancers[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018,18(3):215 – 21.
- [9] Munn D H. The host protecting the tumor from the host-targeting PD-L1 expressed by host cells[J]. *J Clin Invest*, 2018,128(2):570 – 2.
- [10] Aspeslagh S, Matias M, Palomar V, et al. In the immuno-oncology era, is anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy modifying the sensitivity to conventional cancer therapies? [J]. *Eur J Cancer*, 2017,87:65 – 74.

Experimental study of PD-1/PD-L1 signal pathway probe targeting osteosarcoma

Huang Haifeng¹, Zou Huan², Wang Lian¹, Yang Xianteng¹, Zhu Hua³, Li Shanshan⁴

(¹Dept of Orthopaedics, ⁴Dept of Anesthesiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002;

²Dept of Rehabilitation, Guizhou Provincial Staff Hospital, Guiyang 550025; ³Dept of Nuclear Medicine,

Peking University Cancer Hospital & Institute, Key Laboratory of Carcinogenesis and

Translational Research, Ministry of Education/Beijing, Key Laboratory for Research and Evaluation of

Radiopharmaceuticals, National Medical Products Administration, Beijing 100142)

Abstract Objective To explore a non-invasive assay for screening osteosarcoma patients with positive programmed death receptor-1 (PD-1)/programmed death receptor ligand-1 (PD-L1) signaling pathway expression.

Methods The subcutaneous tumor bearing mouse model of human Osteosarcoma cells (OS-732) was established by the method of tumor formation, and toxicity test was performed to verify the toxicity of PD-L1 antibody to mouse organs. ¹²⁴I-anti-PD-L1 monoclonal antibody molecular probe was further synthesized, and OS-732 rats were injected with 18.5 MBq ¹²⁴I-anti-PD-L1 probe in tail vein to start OS-732 osteosarcoma Micro Positron Emission Tomography/Computed Tomography (Micro-PET/CT) imaging. **Results** OS-732 osteosarcoma model was successfully constructed, immunohistochemistry confirmed the presence of PD-L1 expression in OS-732 osteosarcoma, and Micro-PET/CT imaging was successfully performed at different time points (2, 24 and 48 h after probe injection) to achieve non-invasive real-time observation of PD-L1 in OS-732 osteosarcoma. **Conclusion** In this study, the ¹²⁴I-anti-PD-L1 monoclonal antibody molecular probe was constructed *in vitro*, and Micro PET/CT imaging verified that the probe successfully targeted the PD-L1 receptor of OS-732 Osteosarcoma, and showed clear immune imaging, indicating that it is hopeful to achieve non-invasive screening of Osteosarcoma patients with PD-L1 positive expression in clinical practice, and this technology might benefit the majority of Osteosarcoma patients.

Key words osteosarcoma; PD-1; PD-L1; PET/CT; monoclonal antibody; immune checkpoint