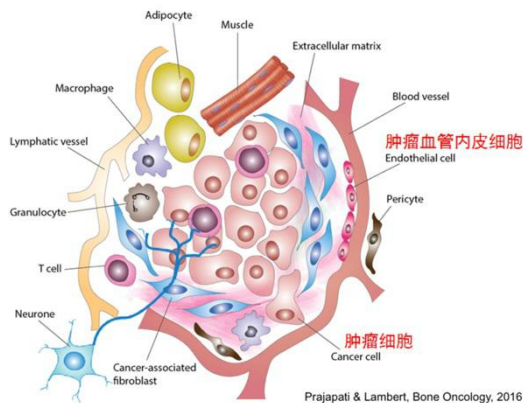


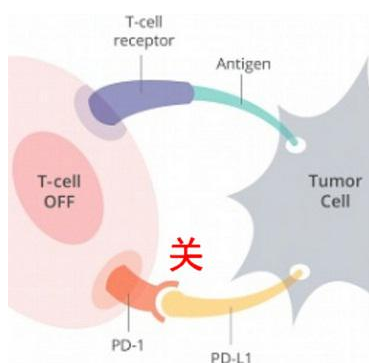
## 肿瘤血管内皮细胞高表达 PD-L1 在免疫治疗中的重要意义

### 肿瘤微环境

功能异常的免疫细胞（如 T-淋巴细胞）、持续的血管增生、肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞 PD-L1 过量表达等，共同构成了适于肿瘤发生、发展及转移的微环境。

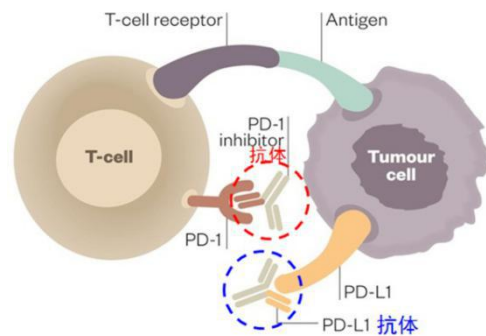


在肿瘤微环境中，T 细胞上表达的 PD-1(programmed death-1)，也就是免疫检查点蛋白(immune checkpoint)，可作为抑制性受体 (receptor)，与表达在其它细胞(如肿瘤细胞)上的相应配体 PD-L1 相结合，从而降低或关掉 T 细胞的免疫杀伤作用，最终导致 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤细胞逃避免疫系统 T-淋巴细胞的攻击。



### 免疫治疗中的 O 药与 K 药

针对实体瘤的免疫治疗有多种形式，目前国内主要使用抗 PD-1 抗体封闭 T 细胞上的 PD-1 分子(如百时美施贵宝的 O 药 Opdivo, 默克/默沙东的 K 药 Keytruda), 或使用抗 PD-L1 抗体封闭肿瘤细胞上的 PD-L1，进而阻断 PD-1 与 PD-L1 的相互结合，维持 T-淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。



### 病理穿刺检测 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤细胞的局限性

以 O 药或 K 药为例，临床对于肿瘤患者使用抗 PD-1 免疫治疗的主要依据是肿瘤细胞高表达 PD-L1 蛋白，检测方法是针对肿瘤组织进行病理穿刺活检。然而肿瘤组织中只有部分肿瘤细胞被  $\gamma$ -干扰素(IFN $\gamma$ )诱导与维持 PD-L1 的高表达，这些活化的肿瘤细胞并非均匀地分布在肿瘤组织中，而是呈不均一、点状分布。因此，临床常规一次性穿刺活检检测 PD-L1<sup>+</sup>

肿瘤细胞，既可能造成漏检，也不能监测 PD-L1 在肿瘤细胞上的动态表达，势必造成不可忽视的假阴性，这一点已得到业内广大医生与专家的公认(Chen et al., 2015 J Clin Invest 125:3384; Zou et al., 2016 Sci Transl Med 8:328)。

### 液体活检检测 PD-L1<sup>+</sup> CTC 的特殊优势

在 CTC 上检测 PD-L1 最大的优势在于无创性、持续动态监测肿瘤细胞是否表达 PD-L1，相对于肿瘤组织检测，极大地提高了适于免疫治疗患者的阳性率，这一点在我们以往监测 HER2<sup>+</sup> CTC 的大规模临床实验中已得到证实 (Li et al., 2018 Clin Cancer Res 24:5261)。自从 PD-L1<sup>+</sup> CTC 被首次报道以来 (Mazel et al., 2015 Mol Oncol 9:1773)，国内外肿瘤界同行相继开展了大量有意义的研究，尤其在肺癌领域，已有多篇相关报道 (Ilie et al., 2018 Ann Oncol 29:193; Guibert et al., 2018 Lung Cancer 120:108)。我们最近合作完成的临床实验发现，在肿瘤组织呈 PD-L1<sup>-</sup> 的肺癌患者中，44% 的患者首次 CTC 检测即可发现 PD-L1<sup>+</sup> CTC。



有报道指出，具有特定突变的 KRAS (G12V) 与肿瘤细胞上的 PD-L1 高表达及肺癌患者的总生存率 (OS) 密切相关 (Falk et al., 2018 Lung Cancer 121:70)。我们已发表的临床研究显示，肿瘤细胞中的染色体异倍体与肿瘤耐药及复发密切相关。由此可见，在分子水平进一步研究染色体异倍体与 KRAS 突变在 PD-L1<sup>+</sup> CTC 中的临床意义，将会成为人们今后研究免疫治疗的热点之一。

### PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤血管内皮细胞抑制性调控 T-淋巴细胞功能

血管内皮细胞 (endothelial cell, EC)、肿瘤细胞及淋巴细胞是肿瘤微环境中的重要组成。肿瘤血管内皮调控淋巴细胞向肿瘤组织迁移 (lymphocyte trafficking)，肿瘤中的血管增生 (angiogenesis) 阻碍血液中的淋巴细胞外渗出血管 (extravasation)，从而严重影响足够量的 T-淋巴细胞向肿瘤组织浸润 (T-cell infiltration)，并最终导致微环境中的肿瘤细胞逃脱淋巴细胞的攻击 (Motz et al., 2013 Immunity 14:1014)。肿瘤血管内皮可分泌、表达多种因子逃避免疫攻击，其中最为重要的因子之一就是 CD31<sup>+</sup> 肿瘤血管内皮细胞上表达的 PD-L1。现已证实，肿瘤血管内皮细胞 (EC) 可被 IFN $\gamma$

激活而高表达 PD-L1，PD-L1<sup>+</sup> EC 则可抑制 CD8<sup>+</sup> T-淋巴细胞的一系列免疫功能(Rodig et al., 2003 Eur J Immunol 33:3117)。

肿瘤组织血管内皮的过量增生与高浓度的血管内皮生长因子 (vesicular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体 VEGFR 密不可分。VEGF/VEGFR 与肿瘤血管内皮细胞上的 PD-L1 相辅相成，可促进肿瘤的发生、发展及转移 (Campeato et al., 2017 Ann Transl Med 5:497)。

### 联合治疗: 抗血管生成及抗 PD-L1 免疫治疗

以往单一使用抗血管生成药物治疗肿瘤患者并不能获得令人满意的疗效, 主要原因之一是抗血管生成治疗可诱导 PD-L1 在肿瘤细胞及血管内皮细胞上的高表达 (Campeato et al., 2017 Ann Transl Med 5:497)。研究表明, 抗血管生成与抗 PD-L1 两种治疗手段相结合, 可促进 HEVs (high endothelial venules) 的生成, 从而促进 T-淋巴细胞向肿瘤组织的浸润并有效杀伤肿瘤细胞。

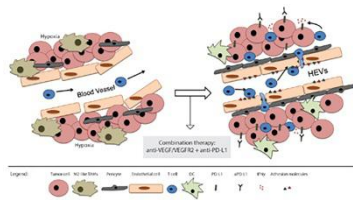


Figure 1 | Illustration of proposed mechanism for combination therapy with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGFR2 and immune checkpoint blockade (ICB). On the left: tumor with abnormal vessels, characterized by a defective structure, poor pericyte coverage. Campeato et al., 2017 Ann Transl Med 5:497

最新在肿瘤动物模型体内完成的医学实验证明, 联合使用抗血管生成药物(anti-VEGFR2) 与抗 PD-L1 免疫治疗, 可相互促进彼此的治疗效果, 免疫治疗增加了抗血管治疗的敏感性, 抗血管治疗又可增加免疫治疗的疗效。该联合治疗方法在乳腺癌及胰腺神经内分泌肿瘤中诱导生成大量的 HEVs, 在减小肿瘤负荷、延长生存期等方面都取得了可观的疗效 (Allen et al., 2017 Sci Transl Med 9:385)。

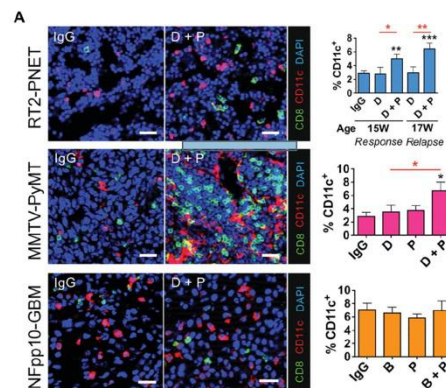
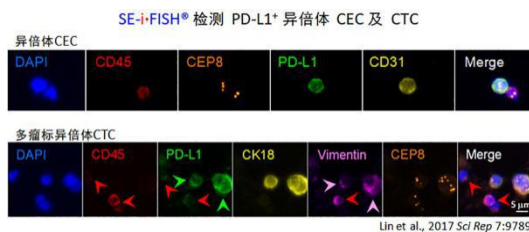


Fig. 4. Combined anti-PD-L1 and antiangiogenic therapy stimulates infiltration and activation of DCs and CTLs in responding tumors (A) Immunofluorescence staining and quantitation of CD8<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> cells in RT2-PNET Allen et al., 2017 Sci Transl Med 9:385

### SE-iFISH 检测 PD-L1<sup>+</sup> 异倍体 CEC 的特殊意义

检测 IFN $\gamma$ 活化的 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤血管内皮细胞(EC)和肿瘤细胞均具有指导临床用药的意义。如上所述, 病理穿刺检测这两类活化细胞存在着不可忽视的假阴性, 而利用液体活检动态监测 PD-L1 在异倍体 CTC 及 CEC 上的表达则成为最佳的补充选择。

肿瘤组织中的肿瘤血管内皮细胞(EC)主要特征为 CD31<sup>+</sup> 且染色体呈异倍体(Hida et al., 2004 *Cancer Res* 64:8249; Akino et al., 2009 *Am J Pathol* 175:2657)。与 CTC 形成原理相似, 肿瘤血管内皮细胞 EC 可脱落入血, 形成循环肿瘤血管内皮细胞 CEC (CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, 异倍体) (Lin et al., 2017 *Sci Rep* 7:9789; Lin, 2018 *Diagnostics (Basel)* 8:26)。



应用赛特 SE-iFISH 整合技术, 同步联合检测 PD-L1<sup>+</sup> 异倍体 CEC、CTC 及多重肿瘤标志物蛋白表达, 不仅可以筛选适于免疫治疗的肿瘤患者, 而且为进一步研究染色体异倍体及其它标志物与免疫治疗疗效的相关性提供了有效的技术平台。

## 展望

随着人们对异倍体 CEC 研究的不断加深, 通过液体活检检测 PD-L1<sup>+</sup> 细胞, 已不再只单纯局限于 CTC。利用 SE-iFISH 技术对异倍体 CTC 和 CEC 同步、原位进行 PD-L1 等其它多重瘤标的蛋白表

型分析及染色体核型分析, 结合后续单细胞测序, 将会为人们在肿瘤早诊、指导靶向用药和免疫治疗、个体化联合用药等方面带来全新的视角, 同时也为广大医务工作者开展有关肿瘤发生、发展、转移、复发等方面的研究提供可靠的技术保障。



## 关于赛特生物 PD-L1 抗体

赛特生物 PD-L1 抗体由美国哈佛医学院达纳法伯癌症研究所 (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School) 提供。该抗体已被国际上多家医院和科研单位广泛应用, 部分相关文献如下:

1. Tumei et al., 2014 *Nature* 515:568
2. RLM et al., 2015 *PNAS* 112:6506
3. Barsoum et al., 2014 *Cancer Res* 74:665
4. Haile et al., 2013 *J Immunol* 191:2829
5. Mahoney et al., 2015 *Cancer Immunol Res* 3:1308
6. Porichis et al., 2011 *Blood* 118:965