

PD-1 抑制剂提高化疗药物对 Raji 细胞株杀伤活性的实验研究

张蕊 李新 李征 江嫣雨 马立 赵明峰 邓琦
天津市第一中心医院血液科 300192
通信作者: 邓琦, Email: kachydeng@126.com
DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.01.015

Study on enhancing the killing activity of chemotherapy drugs by PD-1 inhibitor on Raji cell line

Zhang Rui, Li Xin, Li Zheng, Jiang Yanyu, Ma Li, Zhao Mingfeng, Deng Qi
Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China
Corresponding author: Deng Qi, Email: kachydeng@126.com

弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)是一种常见的非霍奇金淋巴瘤(NHL), R-CHOP方案(利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、甲泼尼龙)显著提高DLBCL患者的总生存率和5年无进展生存率^[1-2]。但仍有患者疾病进展或复发。研究表明程序性死亡受体-1(PD-1)抑制剂联合吉西他滨及顺铂在一线治疗晚期非小细胞肺癌患者中, 总生存期和无进展生存期明显长于吉西他滨或顺铂单药治疗组^[3-4]。本研究中, 我们探讨PD-1抑制剂与DLBCL二线化疗方案中顺铂、卡铂、奥沙利铂、吉西他滨、异环磷酰胺、米托蒽醌、依托泊苷、阿糖胞苷和地塞米松各单药的联合作用, 观察其对Raji细胞株杀伤的影响。

材料与方法

1. 细胞及主要试剂: DLBCL细胞株Raji细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC), LDH细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PD-1抑制剂Nivolumab购自美国百时美施贵宝公司。

2. T细胞制备: 收集2例健康志愿者的外周血标本, 作为本实验的T细胞来源。标本采集经我院伦理委员会批准, 获研究对象知情同意并签署知情同意书。淋巴细胞分离液提取单个核细胞, 磁珠分选试剂盒从提取的单个核细胞中富集CD3⁺T细胞。获得的细胞沉淀用含有IL-2、谷氨酰胺的T细胞专用培养基培养, 第6天收获细胞用于本实验。

3. T细胞与Raji细胞的混合培养比例的选择: 健康志愿者T细胞与Raji细胞按1:1、2:1、5:1和10:1比例混合培养, LDH法检测T细胞对Raji细胞的杀伤活性, 以选择以下实验中的T细胞与Raji细胞比例。

4. PD-1抑制剂浓度的选择: T细胞对Raji细胞按1:1混合培养, 加入不同剂量(18、36、72和144 μg/ml)^[5-6]PD-1抑制剂Nivolumab, LDH法检测对Raji细胞的杀伤活性。

5. 各化疗药浓度的选择: 通过临床用药剂量和查阅文献

确定了各化疗药的体外实验应用范围。吉西他滨0.3~0.6 mg/ml, 卡铂0.1~0.3 mg/ml, 奥沙利铂0.02~0.04 mg/ml, 依托泊苷0.1~0.3 mg/ml, 异环磷酰胺1~3 mg/ml, 米托蒽醌3~6 μg/ml。分别选择剂量范围的最高浓度和最低浓度做了预实验, 最终确定一个合适的药物浓度使单用化疗药物的杀伤活性有效且控制在较低的水平, 以便我们更好观察化疗药物和PD-1抑制剂是否具有协同作用。

6. PD-1抑制剂对化疗单药杀伤Raji细胞的影响: 将浓度为 2×10^5 /ml的T细胞与Raji细胞按1:1比例混合培养到6孔板中; PD-1抑制剂Nivolumab终浓度为36 μg/ml; 各化疗药浓度为: 卡铂0.3 mg/ml、顺铂0.04 mg/ml、吉西他滨0.6 mg/ml、奥沙利铂0.04 mg/ml、异环磷酰胺3 mg/ml、米托蒽醌6 μg/ml、依托泊苷0.3 mg/ml、阿糖胞苷0.04 mg/ml。实验分别设为Raji细胞+T细胞组(空白组)、化疗药组、Nivolumab组以及Nivolumab+化疗组。各组共培养时间为24、48和72 h。

7. 地塞米松对PD-1抑制剂作用的影响: 在Nivolumab抑制剂、T细胞与Raji细胞的培养体系中, 24、48、72和96 h后, 分别加入地塞米松0.08 mg/ml, 与未加入地塞米松的对照组比较地塞米松对Raji细胞杀伤活性的影响。

8. 体外杀伤活性的检测: 各处理组置于含10% FBS的RPMI1640培养基, 37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中培养。按LDH细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作, 采用酶标仪检测490 nm处吸光度(A)值, 计算其杀伤率。每组设3个复孔, 实验重复3次。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{A_{\text{效应细胞自发释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}}{A_{\text{效应细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}} \times 100\%$$

9. 统计学处理: 实验数据均采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 有无地塞米松的两组间比较采用独立样本的t检验, 其他各时点的多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用q检验, 双侧P < 0.05为差异有统计学意义。

结 果

一、不同效靶比T细胞对Raji细胞的杀伤活性

将T细胞与Raji细胞按1:1、2:1、5:1和10:1比例混合培养48 h,杀伤活性分别为0.77%、1.93%、10.73%、35.2%。为了减少T细胞对靶细胞的直接杀伤作用,影响结果的判断,本实验拟选择1:1的效靶比,进行PD-1抑制剂联合作用分析。

二、不同剂量PD-1抑制剂对Raji细胞株的杀伤活性的影响

将浓度为 2×10^5 /ml的T细胞与Raji细胞按1:1比例混合并加入不同浓度PD-1抑制剂Nivolumab培养。结果如图1显示,在不同观察时间,18、36和72 μ g/ml的PD-1抑制剂Nivolumab对Raji细胞的杀伤活性差异无统计学意义($P > 0.05$);而144 μ g/ml的Nivolumab对Raji细胞的杀伤活性高于前3个剂量组(P 值均 < 0.05)。

三、PD-1抑制剂联合化疗药物单药对Raji细胞株的杀伤作用

1. PD-1抑制剂联合顺铂、奥沙利铂或依托泊苷:T细胞与Raji细胞株效靶比为1:1,36 μ g/ml Nivolumab与顺铂、奥沙利铂或依托泊苷联合作用,共培养24、48和72 h检测对靶细胞杀伤活性,与化疗药和Nivolumab组比较,结果显示Nivolumab联合化疗药对Raji细胞株的杀伤作用最显著(P 值均 < 0.01)(图2)。

2. PD-1抑制剂联合阿糖胞苷、异环磷酰胺或卡铂:体系

换用阿糖胞苷、异环磷酰胺或卡铂,共培养24、48和72 h,检测对靶细胞的杀伤活性,结果显示与各单药处理组相比,Nivolumab分别联合阿糖胞苷、异环磷酰胺或卡铂对Raji细胞株的杀伤具有协同作用,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)(图3)。

3. PD-1抑制剂联合吉西他滨或米托蒽醌:体系换用吉西他滨或米托蒽醌,共培养24、48和72 h检测对靶细胞的杀伤活性,结果显示与各单药处理组相比,Nivolumab分别联合吉西他滨、米托蒽醌对Raji细胞株杀伤活性,差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)(图4)。

4. 地塞米松对PD-1抑制剂疗效的影响:T细胞与Raji细胞株效靶比为1:1,加入36 μ g/ml的PD-1抑制剂Nivolumab

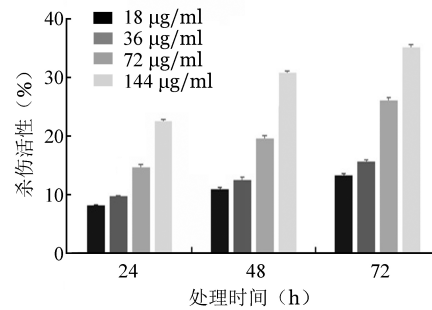


图1 不同剂量PD-1抑制剂Nivolumab联合T细胞对Raji细胞株(效靶比1:1)的杀伤活性(实验设3个复孔,144 μ g/ml组与其余各组比较, $P < 0.05$)

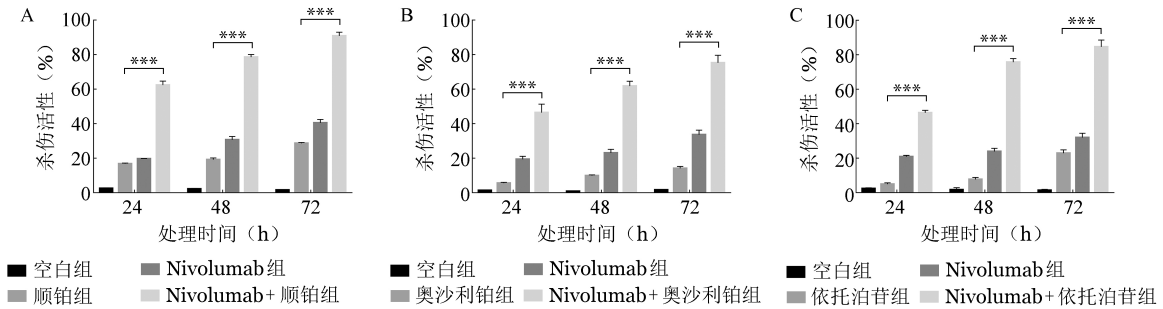


图2 PD-1抑制剂Nivolumab分别联合顺铂(A)、奥沙利铂(B)或依托泊苷(C)对T细胞作用于Raji细胞株(效靶比1:1)的杀伤活性(实验重复3次,*** $P < 0.001$)

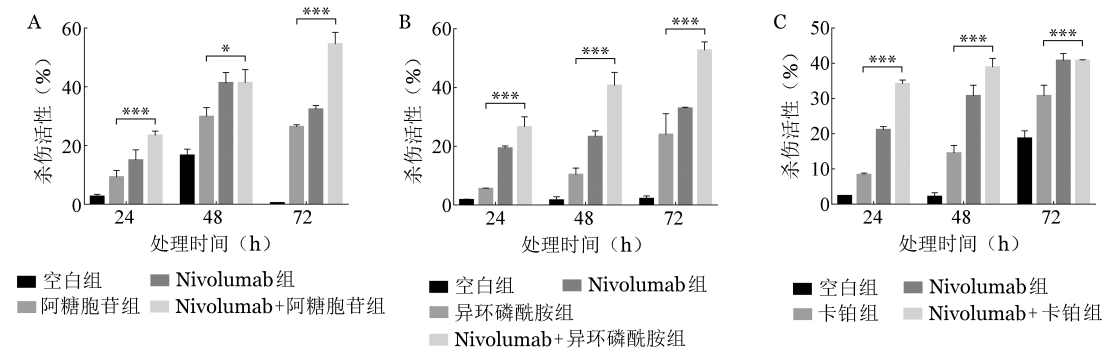


图3 PD-1抑制剂Nivolumab分别联合阿糖胞苷(A)、异环磷酰胺(B)或卡铂(C)对T细胞作用于Raji细胞株(效靶比1:1)的杀伤活性(实验重复3次,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$)

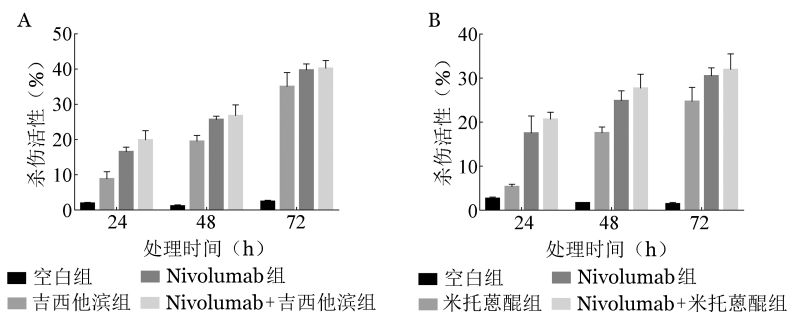


图 4 PD-1 抑制剂 Nivolumab 分别联合吉西他滨或米托蒽醌对 T 细胞作用于 Raji 细胞株(效靶比 1:1)的杀伤活性(实验重复 3 次)

共培养 24、48、72 和 96 h 时,分别加入地塞米松 0.08 mg/ml 继续培养 48 h。结果显示,Nivolumab 处理 24、48 和 72 h 加入地塞米松,抑制 Nivolumab 对 Raji 细胞株的杀伤活性,与未加入地塞米松的对照组比较,差异有统计学意义(P 值均 < 0.001);而 Nivolumab 处理 96 h 加入地塞米松,则不会影响 PD-1 抑制剂对 Raji 的杀伤活性($P = 0.882$)(图 5)。

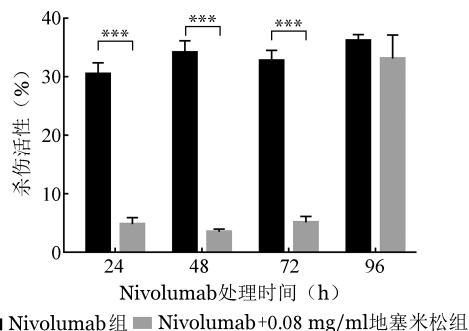


图 5 地塞米松对 PD-1 抑制剂 Nivolumab 联合 T 细胞杀伤 Raji 细胞(效靶比 1:1)的抑制作用(实验重复 3 次,*** $P < 0.001$)

讨 论

化疗药物的抗肿瘤效果受患者免疫状态的影响,化疗药物对免疫缺陷肿瘤患者治疗效果较差^[7]。提示化疗药物的抗肿瘤作用可能通过调节肿瘤患者的免疫系统而得到改善。

PD-1 是一种重要的免疫抑制分子,肿瘤患者 T 细胞高表达 PD-1 导致肿瘤微环境中 PD-1 通路持续激活,PD-1 抑制剂可以阻断负向调控信号,使 T 细胞恢复活性^[8-9],PD-1 有 PD-L1 和 PD-L2 两种配体。PD-1 的主要配体是 PD-L1,表达于恶性肿瘤细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞等多种细胞,PD-L2 则仅表达于巨噬细胞和树突状细胞。PD-1 在活化的 T 细胞表面诱导并防止免疫系统的过度刺激,从而避免对正常组织的损伤。肿瘤细胞高表达 PD-L1,PD-L1 通过与 T 细胞的 PD-1 结合,抑制 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,目前靶向该检查点治疗已取得突破性进展^[10-11]。PD-1 抑制剂已被应用于多种实体肿瘤治疗,以延长无进展生存和总生存期^[12-14]。在以往的临床试验中,PD-1 抑制剂对血液学恶性肿瘤如经典霍奇金淋巴瘤^[15]、

滤泡性淋巴瘤^[16]和 DLBCL^[17]均有治疗效果。近年来有研究表明,DLBCL 患者 PD-1/PD-L1 轴与预后存在相关性^[18]。较高的 PD-1 细胞数量与较差的无事件生存相关。抗 PD-1/PD-L1 药物 Pembrolizumab 联合化疗(培美曲塞+卡铂)组总生存期是单纯化疗组的两倍,无进展生存期也明显延长^[19]。

复发/难治性生发中心(GCB)DLBCL 对 R-DHAP 方案(利妥昔单抗、地塞米松、高剂量阿糖胞苷、顺铂)反应较好^[20]。在本实验中,我们发现 PD-1 抑制剂对二线化疗方案中的顺铂、奥沙利铂和依托泊苷,均具有明显提高其杀瘤活性的作用;与阿糖胞苷、卡铂和异环磷酰胺亦具有协同作用,但较前者为弱;与米托蒽醌和吉西他滨无协同效果。有文献报道在非小细胞肺癌中地塞米松会影响 PD-1 抑制剂疗效,皮质类固醇的免疫抑制作用可能降低 PD-1/PD-L1 阻断剂的效果^[21]。我们在体外实验中发现,延长 PD-1 抑制剂与地塞米松的给药间隔时间(体系加入 PD-1 抑制剂 96 h 后再加入地塞米松)则可解除地塞米松对 PD-1 抑制剂疗效的抑制作用。

本研究结果显示,PD-1 抑制剂 Nivolumab 可提高二线化疗方案中部分药物对 Raji 细胞的杀伤活性,提高疗效。PD-1 抑制剂与化疗单药联合作用分析,可筛选出具有联合作用的化疗单药,进而为临床选择有效的 PD-1 抑制剂与二线化疗方案联合治疗手段提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 2002, 346(4): 235-242. DOI: 10.1056/NEJMoa011795.
- [2] Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte[J]. Blood, 2010, 116(12):2040-2045. DOI: 10.1182/blood-2010-03-276246.
- [3] Rizvi NA, Hellmann MD, Brahmer JR, et al. Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer

- [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34 (25):2969- 2979. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9861.
- [4] Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (22):2078-2092. DOI: 10.1056/NEJMoa1801005.
- [5] Zhang R, Deng Q, Jiang YY, et al. Effect and changes in PD1 expression of CD19 CART cells from T cells highly expressing PD1 combined with reduceddose PD1 inhibitor [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6):3455-3463. DOI: 10.3892/or.2019.7096.
- [6] 朱海波, 邓琦, 张蕊, 等. PD-1抑制剂Nivolumab对CD19嵌合抗原受体T细胞体外增殖和杀伤活性的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39 (7): 584- 588. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.07.011.
- [7] Chang CL, Hsu YT, Wu CC, et al. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (1):119- 127. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2225.
- [8] Giri A, Walia SS, Gajra A. Clinical Trials Investigating Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2016, 11 (4):297- 305. DOI: 10.2174/1574887111666160724181330.
- [9] de Guillebon E, Roussille P, Frouin E, et al. Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2015, 7(8):95-101. DOI: 10.4251/wjgo.v7.i8.95.
- [10] Gargett T, Yu W, Dotti G, et al. GD2-specific CAR T cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(6):1135-1149. DOI: 10.1038/mt.2016.63.
- [11] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance [J]. *Nature*, 2014, 515(7528):568-571. DOI: 10.1038/nature13954.
- [12] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366 (26): 2443- 2454. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
- [13] Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(2):462-468. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2625.
- [14] Kwiecinska A, Tsesmetzis N, Ghaderi M, et al. CD274 (PD-L1)/PDCD1 (PD-1) expression in de novo and transformed diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180 (5):744-748. DOI: 10.1111/bjh.14432.
- [15] Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (4):311- 319. DOI: 10.1056/NEJMoa1411087.
- [16] Westin JR, Chu F, Zhang M, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(1):69-77. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70551-5.
- [17] Armand P, Nagler A, Weller EA, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31 (33):4199- 4206. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.3685.
- [18] Cohen M, Vistarop AG, Huaman F, et al. Cytotoxic response against Epstein Barr virus coexists with diffuse large B-cell lymphoma tolerogenic microenvironment: clinical features and survival impact [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10813. DOI: 10.1038/s41598-017-11052-z.
- [19] Ott PA, Elez E, Hirt S, et al. Pembrolizumab in patients with extensive-stage small-cell lung cancer: results from the phase Ib KEYNOTE-028 Study [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (34):3823-3829. DOI: 10.1200/JCO.2017.72.5069.
- [20] Thieblemont C, Briere J, Mounier N, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(31):4079-4087. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.4423.
- [21] Arbour KC, Mezquita L, Long N, et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36 (28):2872-2878. DOI: 10.1200/JCO.2018.79.0006.

(收稿日期:2019-08-19)

(本文编辑:刘爽)