

PD-L1 单抗对 EGFR 敏感性突变肺癌细胞 PD-L1 表达及对增殖的影响

李 鹏,吕晓东,常玉喜

(河南省肿瘤医院,郑州大学附属肿瘤医院,河南 郑州 450008)

摘 要: [目的] 探讨 PD-L1 单抗对 EGFR 敏感性突变肺癌细胞 PD-L1 的表达及对增殖的影响。 [方法] 选取 2017 年 5 月至 2018 年 8 月在我院呼吸内科治疗的非小细胞肺癌患者 60 例为研究对象,同时选取同期来我院检查的健康人群 30 例为对照。采集外周静脉血,测定血清标本中游离 PD-L1(sPD-L1)蛋白含量。建立肺癌细胞与 T 细胞共培养体系。 [结果] 肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 的表达水平明显高于对照组 ($P<0.001$),而肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 表达水平无统计学差异 ($t=2.584, P=0.086$);野生组与突变组 sPD-L1 表达水平亦无统计学差异 ($t=2.215, P=0.097$)。sPD-L1 表达量与患者性别、年龄、分期无相关性 ($P>0.05$),而与患者的吸烟史、肿瘤转移相关 ($P<0.05$)。EGFR 敏感型 sPD-L1 表达率明显高于 EGFR 野生型 ($t=12.365, P<0.001$)。加入 PD-L1 单抗后,EGFR 的 sPD-L1 的表达水平有明显下降趋势,而 EGFR 野生型与治疗前无统计学差异 ($t=2.154, P=0.958$)。PD-L1 单抗使用后,PC9、HCC827 等 EGFR 敏感型细胞株共同体系中 T 细胞明显增加。 [结论] sPD-L1 表达与 EGFR 敏感性无明显相关性,而与患者是否吸烟、肿瘤转移相关。与此同时,EGFR 敏感突变肺癌细胞行 PD-L1 单抗干预后,sPD-L1 的表达量明显降低,T 细胞增殖明显。

主题词: 肺肿瘤;皮生长因子受体;程序性死亡配体;PD-L1 单抗

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)03-0209-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.03.B007

Effect of Anti PD-L1 Monoclonal Antibody on PD-L1 Expression and Proliferation in EGFR Sensitive Mutant Lung Cancer Cells

LI Peng, LV Xiao-dong, CHANG Yu-xi

(Henan Provincial Oncology Hospital, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of PD-L1 monoclonal antibody on the expression of PD-L1 and proliferation of EGFR-sensitive mutant lung cancer cells. [Methods] Sixty patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated in our respiratory department from May 2017 to August 2018 were enrolled in the study, and 30 healthy subjects served as the control group. Peripheral venous blood was collected to determine the content of free PD-L1 in serum samples (sPD-L1). A co-culture system of lung cancer cells and T cells was established. [Results] The expression of sPD-L1 in patients with lung squamous cell carcinoma and those with lung adenocarcinoma was significantly higher than that in control group ($P<0.001$), but there was no significant difference in the expression of sPD-L1 between lung squamous cell carcinoma group and lung adenocarcinoma group ($t=2.584, P=0.086$), and there was no significant difference between wild tumor group and mutant tumor group ($t=2.215, P=0.097$). The expression of sPD-L1 was not correlated with gender, age and stage ($P>0.05$), but correlated with smoking history and tumor metastasis ($P<0.05$). The expression rate of sPD-L1 in EGFR-sensitive type was significantly higher than that in EGFR-wild type ($t=12.365, P<0.001$) before the treatment with PD-L1 monoclonal antibody. After adding PD-L1 monoclonal antibody, the expression of mPD-L1 in EGFR-sensitive type decreased significantly, but there was no significant difference before and after treatment in wild-type EGFR type ($t=2.154, P=0.958$). After PD-L1 monoclonal antibody treatment, the number of T cells in co-culture system with EGFR-sensitive cell lines (C9, HCC827) was increased significantly. [Conclusion] The expression of sPD-L1 is not correlated with EGFR sensitivity, but with smoking and tumor metastasis. Expression of sPD-L1 is decreased in EGFR-sensitive mutant lung cancer cells treated with PD-L1 monoclonal antibody, which is associated with proliferation of T cells.

Subject words: lung neoplasms; skin growth factor receptor; programmed death ligand; PD-L1 monoclonal antibody

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(2018020507)

通信作者: 李鹏,博士;河南省肿瘤医院/郑州大学附属肿瘤医院呼吸内科,河南省郑州市金水区纬四路9号(450008);

E-mail: 15036013523@163.com

收稿日期: 2018-07-25; **修回日期:** 2018-12-14

大多数晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)均有明确的基因突变,且在肿瘤的发生发展中起到了关键性的作用^[1],其中表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)已经成为重要的治疗靶点。多项研究表明,在肿瘤发展过程中,程序性死亡受体-1(programmed cell death-1, PD-1)组成的信号通路可介导肿瘤的免疫逃逸^[2]。本研究旨在探讨 PD-L1 单抗对 EGFR 敏感型突变肺癌细胞 sPD-L1 表达及其对增殖的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性收集 2017 年 5 月至 2018 年 8 月在我院呼吸内科治疗的非小细胞肺癌患者共 60 例为研究对象,其中男性 26 例,女性 34 例,年龄 35~76 岁,平均年龄(52.5 ± 6.8)岁;ⅢA 期 9 例、ⅢB 期 12 例,Ⅳ期 39 例。其中肺腺癌 34 例,肺鳞癌 26 例;同时选取同期来我院检查的健康人群 30 例为对照组。其中男性 14 例,女 16 例,年龄 36~78 岁,平均年龄(54.2 ± 6.6)岁。纳入标准^[3]:①非小细胞肺癌患者按照肺肿瘤病理学和遗传学分类标准(2004)进行分类,且按照国际肺癌研究学会公布的非小细胞肺癌Ⅲ~Ⅳ期的分期标准进行分期;②行荧光定量 PCR 检测 EGFR 基因突变结果。排除标准:除非小细胞肺癌外还伴有其余肿瘤者。患者均知情同意,同时经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 培养基购于美国 Gibco 公司;10%胎牛血清购于美国 Hyclone 公司;1%青霉素购于美国 Gibco 公司、阻断型抗 PD-L1 单克隆抗体 2H11。

1.3 主要器材与仪器

EGFR 敏感基因突变肺癌细胞株(PC9、HCC827)、EGFR 野生型肺癌细胞株(A549、H1299);温控离心机购于法国 Jouan 公司;FC500 流式细胞仪、Expo32 Multicomp 软件购于美国 Beckman-Coulter 公司。

1.4 方法

1.4.1 标本收集

患者入院次日,抽取静脉血 5ml,静置 30min 后,将血液标本进行离心 15min,2000r/min。取上清液,并置于-80℃的环境下保存,以待统一处理。与此

同时,将患者与志愿者的临床资料进行记录统计。

1.4.2 测定血清标本中 sPD-L1 蛋白含量

将抗 PD-L1 单抗稀释至 3g/ml 后包被 ELISA 酶标板,放入 4℃环境下,过夜。于次日进行 PBS 洗涤,以 3%BSA 25℃封闭 60min 后,再次行 PBS 洗涤。随后依次加入 PD-L1 1g 融合蛋白、biotin-10D7、Streptavidin-HRP、辣根过氧化物酶的反应底物 TMB,每次反应完成后,皆行 3 次 PBS 洗涤。最后加入 H₂SO₄ 以终止反应。最后用酶标仪检测吸光度值(A450nm),并制定标准曲线,以检测 sPD-L1 含量^[4]。

1.4.3 肺癌细胞株培养

对肺癌细胞株突变型 PC9、HCC827 以及野生型的 A549、H1299 进行常规复苏,并置于 RPMI-1640 培养基中进行培养,对细胞生长状况进行观察,并取对数生长期的细胞进行实验。建立肺癌细胞与 T 细胞培养体系,采用抗 PD-L1 单抗对体系中的肺癌细胞与 T 淋巴细胞进行干预。用流式细胞柱法检测抗 PD-L1 单抗对肿瘤表面 PD-L1 表达的影响。用 CCK-8 法检测 PD-L1 单抗对 T 淋巴细胞增殖的影响。

1.5 统计学处理

数据应用 SPSS18.0 进行分析,其中计数资料进行 χ^2 检验,计量资料进行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌 sPD-L1 表达水平

肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 的表达水平明显高于对照组($P < 0.001$),而肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 表达水平无统计学差异($t = 2.584$, $P = 0.086$)(Table 1)。

肺腺癌患者荧光定量 PCR 检测 EGFR 基因突变结果显示,EGFR19 号外显子突变患者 10 例,21 号外显子突变患者 12 例,将这 22 例患者划分为突变组。EGFR 敏感基因未发生突变者 12 例,划分为野生组。野生组 sPD-L1 水平(1.465 ± 0.350 ng/ml)与突变组(1.478 ± 0.325 ng/ml)sPD-L1 表达水平无统计学差异($t = 2.215$, $P = 0.097$)。

2.2 sPD-L1 表达水平与肺癌病理特征间的关系

肺腺癌患者血清中 sPD-L1 表达量的中位数为 1.145ng/ml,以其为界值, ≥ 1.145 ng/ml 为高表达, < 1.145 ng/ml 为低表达。sPD-L1 表达量与患者性别、年

Table 1 Comparison of sPD-L1 expression in blood samples

Group	N	sPD-1 level(ng/ml)
Lung squamous cell carcinoma	26	1.405±0.421
Lung adenocarcinoma	34	1.478±0.325
Control group	30	1.005±0.215

龄、分期无相关性($P>0.05$),而与患者的吸烟史、肿瘤转移相关($P<0.05$)(Table 2)。

2.3 EGFR 敏感突变肺癌细胞株 sPD-L1 表达情况

加入 PD-L1 单抗前,EGFR 敏感型 sPD-L1 表达率明显高于 EGFR 野生型($t=12.365, P<0.001$),而加入 PD-L1 单抗后,EGFR 的 sPD-L1 的表达水平有明显下降趋势,而 EGFR 野生型与治疗前无统计学差异($t=2.154, P=0.958$)(Table 3)。

2.4 抗 PD-L1 单抗对共同培养体系中 T 细胞增殖的影响

PD-L1 单抗使用后,PC9、HCC827 等 EGFR 敏感型细胞株共同体系中 T 细胞明显增加(均 $P<0.001$),而 H1299、A49 等野生型干预前后无统计学差异($t=5.658, 4.582, P=1.358, 1.658$)(Table 4)。

3 讨论

随着分子生物学与信号传导研究的深入,有研究表明 PD-1 单抗,纳武单抗(Nivolumab)联合厄洛替尼(EGFR 酪氨酸激酶抑制剂,EGFR-TKI)等药物,在 EGFR 敏感性基因突变的晚期非小细胞肺癌患者治疗中,能够明显提高客观缓解率及生存时间,但也有研究不支持该结果,因此目前尚无可用于一线治疗的证据^[5]。本研究利用体外实验,以探究抗 PD-L1 单抗对 EGFR 敏感突变肺癌细胞 PD-L1 的表达及对 T 细胞增殖的影响。

PD-L1 是 PD-1 的一个配体,是 B7 家族中的一员,常表现在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞以及 NK 细胞的表面,并且其存在能够参与 T 淋巴细胞的免疫应答^[6,7]。本研究肺癌患者的血标本行 sPD-L1 表达水平检测结果显示,肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 的表达水平明显高于对照组,而肺鳞癌组与肺腺癌组 sPD-L1 表达水平无明显差异。同时 EGFR19 号外显子突变患者 10 例,21 号外显子突变患者 12 例,将这 22 例患者划分为突变组;EGFR 敏感基因未

发生突变者 12 例划分为野生组。野生组与突变组 sPD-L1 表达水平亦无明显差异($P=0.097$)。根据肺腺癌血清中 sPD-L1 的表达水平, $\geq 1.145\text{ng/ml}$ 为高表达, $<1.145\text{ng/ml}$ 为低表达。sPD-L1 表达量与患者性别、年龄、分期无相关性($P>0.05$),而与患者的吸烟史、肿瘤转移相关($P<0.05$),表明 sPD-L1 表达水平与 EGFR 敏感性无明显相关性,而与患者是否吸烟、肿瘤转移相关。

已有研究证明,MEK/ERK、STAT3、PI3K/Akt、JAK/STAT 等通路皆参与肿瘤细胞 PD-L1 的表达调控^[8]。亦有研究表明,在非小细胞肺癌中,EGFR 是常见的突变基因之一,其可以与胞外配体结合,并行同源/异源二聚化,从而促使胞内氨基酸残基进行自身磷酸化^[9]。被激活的受体具有募集信号复合体的作用,从而激活信号转导通路,例如 Ras/Raf/MEK、

Table 2 Relationship between sPD-L1 expression and pathological features of lung cancer

Factors		sPD-L1		χ^2	P
		Low expression	High expression		
Gender	Male	6	7	1.257	1.254
	Female	10	11		
Age(years old)	≥ 60	7	8	1.355	1.358
	<60	9	10		
Smoking	Yes	5	12	6.357	<0.001
	No	11	6		
Stage	III	6	7	0.265	3.584
	IV	10	11		
Metastasis	M0	9	3	5.328	<0.001
	M1~3	7	15		

Table 3 sPD-L1 expression of EGFR sensitive mutated in lung cancer cell lines

Type	Strain	Expression rate of sPD-L1(%)	
		Before intervention	After intervention
EGFR sensitive mutation	PC9	79.0±2.9	65.0±2.8
	HCC827	84.2±3.0	73.5±2.7
EGFR wild type	A549	19.3±4.0	21.3±2.6
	H1299	28.0±3.9	28.5±3.0

Table 4 Effect of anti PD-L1 monoclonal antibody on T cell proliferation in co-culture system

Group	PC9	HCC827	H1299	A549
Before intervention	0.520±0.086	0.491±0.078	0.588±0.071	0.460±0.077
After intervention	2.075±0.030	1.986±0.041	0.561±0.052	0.577±0.012
t	9.245	10.365	5.658	4.582
P	<0.001	<0.001	1.358	1.658

PI3K/Akt/mTOR, 随后对肺癌细胞的生长、分化以及转移进行调节^[10]。本研究结果亦显示加入抗 PD-L1 单抗前, EGFR 敏感型 sPD-L1 表达率明显高于 EGFR 野生型, 而加入抗 PD-L1 单抗后, EGFR 的 sPD-L1 的表达水平有明显下降趋势, 而 EGFR 野生型与治疗前无明显差异, 这与其他研究结果相同, EGFR 基因与 PD-L1 的表达存在一定的关联。

T 淋巴细胞通过多种正/负性刺激信号可参与抗肿瘤免疫中基础的细胞免疫应答。因此对于干预前后的细胞吸光度进行统计, 结果发现抗 PD-L1 单抗使用后, PC9、HCC827 等 EGFR 敏感型细胞株共同体系中 T 细胞明显增加, 而 H1299、A49 等野生型干预前后无明显区别, 表明抗 PD-L1 抗体可以通过调节 T 淋巴细胞的增殖而增加机体免疫力, 亦可以通过抑制负性共刺激信号通路刺激细胞免疫对肿瘤的免疫杀伤。

综上所述, sPD-1 表达与 EGFR 敏感性无明显相关性, 而与患者是否吸烟、肿瘤转移相关。与此同时, EGFR 敏感突变肺癌细胞行抗 PD-L1 单抗干预后, sPD-L1 的表达量明显降低, 而 T 细胞增殖明显。

参考文献:

- [1] Carretero-gonzález A, Lora D, Ghanem I, et al. Analysis of response rate with anti PD1/PD-L1 monoclonal antibodies in advanced solid tumors: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(9): 8706–8715.
- [2] Zhang ZH, Zhou J, Zhang WM. Effects of epithelial-interstitial transformation on radiosensitivity of EGFR mutant non-small cell lung cancer cell line PC-9[J]. *Journal of Applied Medicine*, 2017, 33 (10): 1576–1580. [张志浩, 周娟, 张为民. 上皮间质转化对 EGFR 突变型非小细胞肺癌细胞株 PC-9 放射敏感性的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(10): 1576–1580.]
- [3] Zhang LQ, Chen Y, Pan X, et al. The level of soluble programmed death ligand 1 in peripheral blood of patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR sensitive mutation and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of Medicine*, 2016, 96(48): 3870–3874. [张柳琴, 陈颖, 潘雪, 等. EGFR 敏感突变中晚期肺腺癌患者外周血中可溶性程序性死亡配体 1 的水平及其临床意义[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(48): 3870–3874.]
- [4] Zhao F, Miao YL, Cao SY. Effect of gefitinib on prognosis of patients with brain metastases from EGFR sensitive mutant lung adenocarcinoma[J]. *Journal of Oncology*, 2018, 24(3): 221–225. [赵峰, 苗怡然, 曹生亚. 吉非替尼对 EGFR 敏感突变肺腺癌脑转移患者的预后影响 [J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(3): 221–225.]
- [5] Sun LY, Zhou J, Cheng YJ, et al. Correlation between EGFR gene mutation and radiosensitivity in non-small cell lung cancer[J]. *Guangdong Medicine*, 2017, 38(7): 981–985. [孙立越, 周娟, 程燕君, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与放射敏感性的相关性 [J]. *广东医学*, 2017, 38(7): 981–985.]
- [6] Wu HT, Wang X, Guo YF, et al. The relationship between EMT and EGFR mutation status in advanced lung adenocarcinoma and its effect on the treatment of gefitinib[J]. *Cancer Progression*, 2016, 14(8): 757–760. [吴辉塔, 王馨, 郭艺芳, 等. 晚期肺腺癌 EMT 和 EGFR 突变状态的关系及其对吉非替尼治疗疗效的影响[J]. *癌症进展*, 2016, 14(8): 757–760.]
- [7] Su YD, Chen P. Progress of EGFR-TKIs in the treatment of brain metastasis of sensitive mutant lung cancer [J]. *Research on the Prevention and Treatment of Cancer*, 2017, 44(10): 698–700. [苏雨栋, 陈鹏. EGFR-TKIs 治疗敏感突变肺癌脑转移的研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2017, 44(10): 698–700.]
- [8] Donahue RN, Lepone LM, Grenga I, et al. Analyses of the peripheral immunome following multiple administrations of avelumab, a human IgG1 anti-PD-L1 monoclonal antibody [J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 20.
- [9] Maekawa N, Konnai S, Takagi S, et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 8951.
- [10] Jiang XW, Wang WX, Zhang YP. Clinical analysis of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with Ectini in EGFR sensitive mutation[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2016, 19(4): 200–206. [蒋小雯, 王文娟, 张沂平. 埃克替尼治疗 EGFR 敏感突变的晚期非小细胞肺癌获益患者的临床分析 [J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(4): 200–206.]