

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.16.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230711.1907.006\(2023-07-12\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230711.1907.006(2023-07-12))安罗替尼联合 PD-1 单抗治疗 Lewis 肺癌的动物实验研究^{*}陈 熙^{1,2}, 赵晓龙³, 饶 文⁴, 杨宇馨¹, 代晓燕¹, 熊艳丽¹, 戴 楠¹, 王 东^{1△}

(1. 陆军军医大学陆军特色医学中心/大坪医院肿瘤科, 重庆 400042; 2. 重庆市渝北区人民医院

肿瘤血液科 401120; 3. 解放军第 956 医院外一科, 西藏林芝 860000;

4. 陆军第 75 集团军医院感染科, 云南大理 671003)

[摘要] **目的** 探讨安罗替尼联合程序性死亡受体 1(PD-1)单抗治疗 Lewis 肺癌的增强效果,并初步探索其可能的机制。**方法** 构建 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,将其分为对照组、安罗替尼组、PD-1 单抗组和联合组。测量各组小鼠肿瘤质量,利用免疫组织化学检测肿瘤组织免疫细胞浸润和微血管密度,采用细胞因子芯片对各组小鼠血清细胞因子进行检测。**结果** 与对照组比较,安罗替尼组和联合组移植瘤质量明显减少,安罗替尼组低于 PD-1 单抗组($P<0.05$)。PD-1 单抗组、安罗替尼组和联合组抑瘤率分别为 -15.35% 、 73.91% 和 86.96% 。与对照组比较,CD4、CD8 水平在安罗替尼组、PD-1 单抗组和联合组有不同程度升高,且联合组 CD4 水平较 PD-1 单抗组升高,CD8 水平较安罗替尼组升高($P<0.05$)。与对照组比较,CD68 水平在安罗替尼组和联合组有不同程度升高($P<0.05$)。与对照组比较,CD206 水平在 PD-1 单抗组和联合组有不同程度降低,且 PD-1 单抗组低于联合组($P<0.05$)。与对照组比较,安罗替尼组和联合组新生血管、MVD 减少($P<0.05$)。与对照组比较,联合组 CCL5 水平升高,CXCL1 水平降低($P<0.05$)。**结论** 安罗替尼联合 PD-1 单抗可能通过调节细胞因子 CCL5 和 CXCL1,增加肿瘤浸润 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞,有效抑制小鼠肺癌移植瘤的生长。

[关键词] 肺癌;抗血管生成治疗;免疫检查点抑制剂;安罗替尼;程序性死亡受体 1;动物实验**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)16-2409-07Animal experimental study of anlotinib combined with PD-1 monoclonal antibody in the treatment of Lewis lung cancer^{*}CHEN Xi^{1,2}, ZHAO Xiaolong³, RAO Wen⁴, YANG Yuxin¹, DAI Xiaoyan¹,XIONG Yanli¹, DAI Nan¹, WANG Dong^{1△}

(1. Army Specialty Medical Center, Army Medical University/Department of Oncology, Daping

Hospital, Chongqing 400042, China; 2. Department of Oncology Hematology, Yubei District

People's Hospital of Chongqing, Chongqing 401120, China; 3. Surgery 1 Section,

People's Liberation Army 956 Hospital, Nyingchi, Tibet 860000, China; 4. Department

of Infectious Diseases, The 75th Group Army Hospital, Dali, Yunnan 671000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the enhanced effect of anlotinib combined with programmed cell death protein 1 (PD-1) monoclonal antibody in the treatment of Lewis lung cancer, and explore its possible mechanism. **Methods** Lewis lung cancer bearing mice were constructed and divided into the control group, the anlotinib group, the PD-1 monoclonal antibody group, and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group. The tumor mass of the mice in each group was measured, the tumor tissue immune cell infiltration and microvessel density were detected by immunohistochemistry, and the serum cytokines of the mice in each group were detected by cytokine chip. **Results** Compared with the control group, the mass of transplanted tumor in the anlotinib group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group was significantly reduced, and the anlotinib group was lower than the PD-1 monoclonal antibody group ($P<0.05$). The tumor inhibition rates of the PD-1 monoclonal antibody group, the anlotinib group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group were -15.35% , 73.91% and 86.96% , respectively. Compared with the control group, the levels of CD4 cells

^{*} 基金项目:陆军军医大学临床医学科研人才培养计划(2019XLC3057);陆军特色医学中心人才创新能力培养计划(2019CXLC006)。

作者简介:陈熙(1991—),主治医师,学士,主要从事肿瘤内科疾病研究。△ 通信作者,E-mail:dongwang64@hotmail.com。

and CD8 were increased in the anlotinib group, the PD-1 monoclonal antibody group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group, and the CD4 level in the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group was higher than that in the PD-1 monoclonal antibody group, and the CD8 level was higher than that in the anlotinib group ($P<0.05$). Compared with the control group, CD68 level was increased in the anlotinib group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group ($P<0.05$). Compared with the control group, CD206 levels in the PD-1 monoclonal antibody group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group were decreased to different degrees, and the PD-1 monoclonal antibody group was lower than the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group ($P<0.05$). Compared with the control group, the neovascularization and MVD in the anlotinib group and the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group were decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the serum level of CCL5 was significantly increased ($P<0.05$), while CXCL1 was significantly decreased ($P<0.05$) in the anlotinib+PD-1 monoclonal antibody group. **Conclusion** Anlotinib combined with PD-1 monoclonal antibody can significantly inhibit the growth of lung cancer xenografts in mice by regulating the cytokines CCL5 and CXCL1, increasing tumor infiltration of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells.

[Key words] lung cancer; anti-angiogenic therapy; immune checkpoint inhibitors; anlotinib; programmed cell death protein 1; animal experiment

肺癌是癌症死亡的主要原因,占全球癌症死亡总数的 18.0%^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最主要的类型,约占所有肺癌的 85%^[2]。大部分的 NSCLC 患者在确诊时已经属于晚期,失去了手术根治的机会,总体预后较差^[3]。2022 年中国和美国癌症统计数据估计,肺癌将成为中美两国男性和女性的最大死因^[4]。近 20 年来,靶向治疗与免疫治疗进展迅速,晚期 NSCLC 的诊疗方案也逐步走向精准化^[5]。以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)为主的靶向治疗已成为驱动基因突变患者公认的一线治疗方案;而对于驱动基因阴性的患者来说,以免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)为代表的免疫治疗联合化疗则是指南推荐的一线标准治疗模式之一。同时,为了减少化疗的不良反应,临床上也期待部分人群能够使用“Chemo-free”的治疗方案以实现高效低毒的肿瘤治疗目标。基于上述需求,研究者们开展了多项基础和临床研究,以期探索更有效的联合治疗方案,其中,抗血管生成药物联合免疫治疗就是当前研究的热点,也是最具潜力的方案之一。

从机制上来看,新生血管是肿瘤生长和转移的重要过程^[6],抗血管生成治疗已被公认为一种有效的肿瘤治疗模式^[7]。安罗替尼作为一种新型的抗血管生成药物,是一种口服的小分子 TKI,可针对血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)1、VEGFR2/KDR、VEGFR3、c-Kit、血小板源生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)- α 和成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)1、FGFR2 和 FGFR3 等多个靶点,具有更广泛、更有效的抗肿瘤效应^[8]。2020 年我国学者通过对结肠癌、肾癌和胰腺癌患者的组织标本检测和小鼠实验,发现安罗替尼可

下调肿瘤组织血管内皮细胞的程序性死亡受体 1 (PD-1)表达,影响 CD8⁺ T 细胞浸润从而抑制肿瘤生长^[9]。随后,在一项小样本量的回顾性研究中,发现 26 例晚期肿瘤患者(肺癌、胆囊癌、子宫内膜癌、胃癌、胰腺癌、阴茎癌和黑色素瘤)进行安罗替尼联合 ICIs 的一线至三线治疗,患者均可获得一定疗效且对药物不良反应耐受性良好^[10]。但安罗替尼联合 ICIs 的机制及对肿瘤组织免疫微环境和全身免疫状态的影响尚未完全清楚。本实验利用安罗替尼联合 PD-1 单抗处理 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,在证实联合治疗疗效的同时,进一步探索联合治疗对免疫微环境的影响及其相关机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6 雌性小鼠(6~8 周龄)购自陆军特色医学中心实验动物中心,小鼠 Lewis 肺癌细胞(lewis lung cancer, LLC)购自中科院细胞库。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶等细胞培养试剂和基质胶均购自美国 Corning 公司;免疫组织化学相关抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;免疫组织化学抗原修复缓冲液乙二胺四乙酸购自福州迈新生物技术开发有限公司;安罗替尼由正大天晴药业集团(中国南京)提供;注射用小鼠 PD-1 单抗(克隆 RMP1-14)购自美国 BioXCell 公司;CD4(批号 ab183685)、CD206(抗甘露糖受体抗体,批号 ab64693)、CD68(批号 ab283654)、CD31(批号 ab-28364)购自美国 Abcam 公司;CD8(批号 98941)购自美国 CST 公司;辣根过氧化物酶标记的小鼠/兔通用型二抗(批号 SAP-9100)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将冻存的 LLC 在 37℃ 的水浴锅中快速振荡解

冻后在无菌台上进行操作,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基后离心,弃上清液,加入适量 DMEM 培养基,吹打混匀后得到细胞悬液,置于细胞培养箱(37℃,5% CO₂)。当培养皿中的细胞密度达到 80%~90% 时,按 1:2 的比例进行细胞传代培养。收集细胞并计数,用于构建 LLC 小鼠移植瘤模型。

1.2.2 LLC 小鼠移植瘤模型

提前备好基质胶,将收集好的 LLC 用磷酸盐缓冲液稀释重悬后计数,得到浓度为 1×10^7 个/mL 细胞悬液,将细胞悬液与基质胶按照 1:1 比例充分混匀,取 100 μ L 上述混悬液(含 5×10^5 个细胞)用注射器在小鼠左后肢内侧腹股沟处皮下接种。

1.2.3 实验分组与处理

小鼠成瘤率超过 50% 时将其分为对照组、安罗替尼组、PD-1 单抗组、联合组,每组 5 只。给药方式:安罗替尼组每天灌胃安罗替尼(2.25 mg/kg),给药 12 d;PD-1 单抗组于第 1、3、5、7 天腹腔注射 PD-1 单抗(10 mg/kg);对照组灌胃和腹腔注射同等剂量生理盐水。给药期间每天观察小鼠情况,在第 13 天收集各组荷瘤小鼠眼球血,颈椎脱臼处死,完整切取皮下移植瘤。肿瘤组织用电子天平称取质量,并按以下公式计算抑瘤率:抑瘤率(%)=(对照组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 免疫组织化学

小鼠肿瘤组织用 4% 甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片,置于 60℃ 孵箱中 3 h,采用二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇、75% 乙醇脱蜡水化。切片于缓冲液乙二胺四乙酸中抗原修复 10 min,置入 3% 过氧化氢-甲醇溶液中浸泡 15 min,磷酸盐缓冲液洗 3 次,每次 5 min,晾干后加入山羊血清封闭 30 min,之后滴加一抗如下:CD4 使用时按照 1:1 000 稀释,CD8 使用时按照 1:300 稀释,CD206 使用时按照 1:5 000 稀释,CD68 使用时按照 1:100 稀释,CD31 使用时按照 1:50 稀释;将滴加抗体的切片放入切片盒,置于 4℃ 冰箱过夜。次日取出切片盒,常温下复温 1 h,并用磷酸盐缓冲液洗 3 次,每次 3 min。迅速滴加辣根过氧化物酶标记的小鼠/兔通用型二抗,置于 37℃ 孵箱,30 min 后取出,磷酸盐缓冲液洗 2 次,每次 5 min。滴加 DAB 显色,冲洗后用苏木素复染,脱水封片、显微镜观察并拍照。

1.2.5 免疫细胞和微血管密度(microvessel density, MVD)计数

在显微镜高倍镜(200 $\times$)下对每张切片的染色区域采集 4 个视野图片,计数每张图片阳性细胞数量后取平均值,即为 CD4、CD8、CD68、CD206 阳性细胞数。CD31 阳性染色定位于血管内皮细胞细胞质和/或细胞膜,呈棕黄色颗粒。肿瘤间质区任何黄染的细胞或细胞簇即使未显示管状结构均计为 1 个微血管,内径 >8 个红细胞或有较厚肌层的血管不计数为微血

管。在低倍镜下选取 3 个肿瘤微血管最丰富的区域,计算单位面积下微血管的数目,取平均值作为 MVD。

1.2.6 细胞因子检测

采用 Raybiotech 细胞因子芯片试剂盒,按照说明书流程检测,简要步骤如下:将血清 4℃,10 000 r/min,离心 10 min,将上清液 2 倍稀释后取 100 μ L 行芯片检测。取芯片,每孔加入 100 μ L 封闭液,室温下封闭 30 min。移除封闭液,加入稀释后的样品,4℃ 过夜。Wash Buffer 洗涤后,加入 Biotin-Antibody Cocktail,孵育 2 h,洗涤。加入 Cy3-Streptavidin,避光混匀,室温孵育 1 h,洗涤后采用 Agilent SureScan Dx Microarray Scanner 芯片扫描仪,532 nm 扫描芯片。

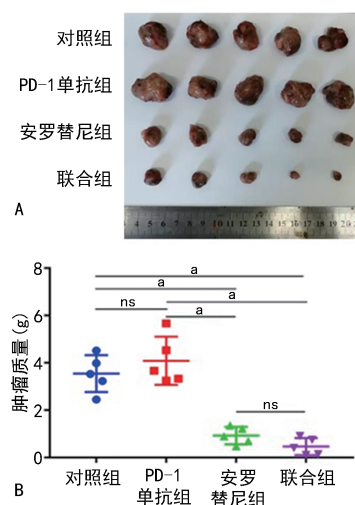
1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism7.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 安罗替尼联合 PD-1 单抗明显抑制 LLC 的生长

与对照组比较,安罗替尼组和联合组移植瘤质量明显减少,安罗替尼组低于 PD-1 单抗组($P < 0.05$),见图 1。PD-1 单抗组、安罗替尼组和联合组抑瘤率分别为 -15.35%、73.91% 和 86.96%。



A: LLC 小鼠移植瘤大体; B: 肿瘤质量; a: $P < 0.05$; ns: $P > 0.05$ 。

图 1 各组小鼠移植瘤生长情况

2.2 安罗替尼联合 PD-1 单抗对 LLC 移植瘤组织免疫细胞浸润的影响

与对照组比较,CD4、CD8 水平在安罗替尼组、PD-1 单抗组和联合组有不同程度升高,且联合组 CD4 水平较 PD-1 单抗组升高,CD8 水平较安罗替尼组升高($P < 0.05$)。与对照组比较,CD68 水平在安罗替尼组和联合组有不同程度升高($P < 0.05$)。与对照组比较,CD206 水平在 PD-1 单抗组和联合组有不同程度降低,且 PD-1 单抗组低于联合组($P < 0.05$),见图 2、3。

2.3 安罗替尼联合 PD-1 单抗对血管生成的影响

与对照组比较,安罗替尼组和联合组新生血管、MVD 减少($P<0.05$),见图 4。

2.4 安罗替尼联合 PD-1 单抗影响血清中细胞因子的水平

与对照组比较,联合组 CCL5 水平升高,CXCL1 水平降低($P<0.05$),见表 1。

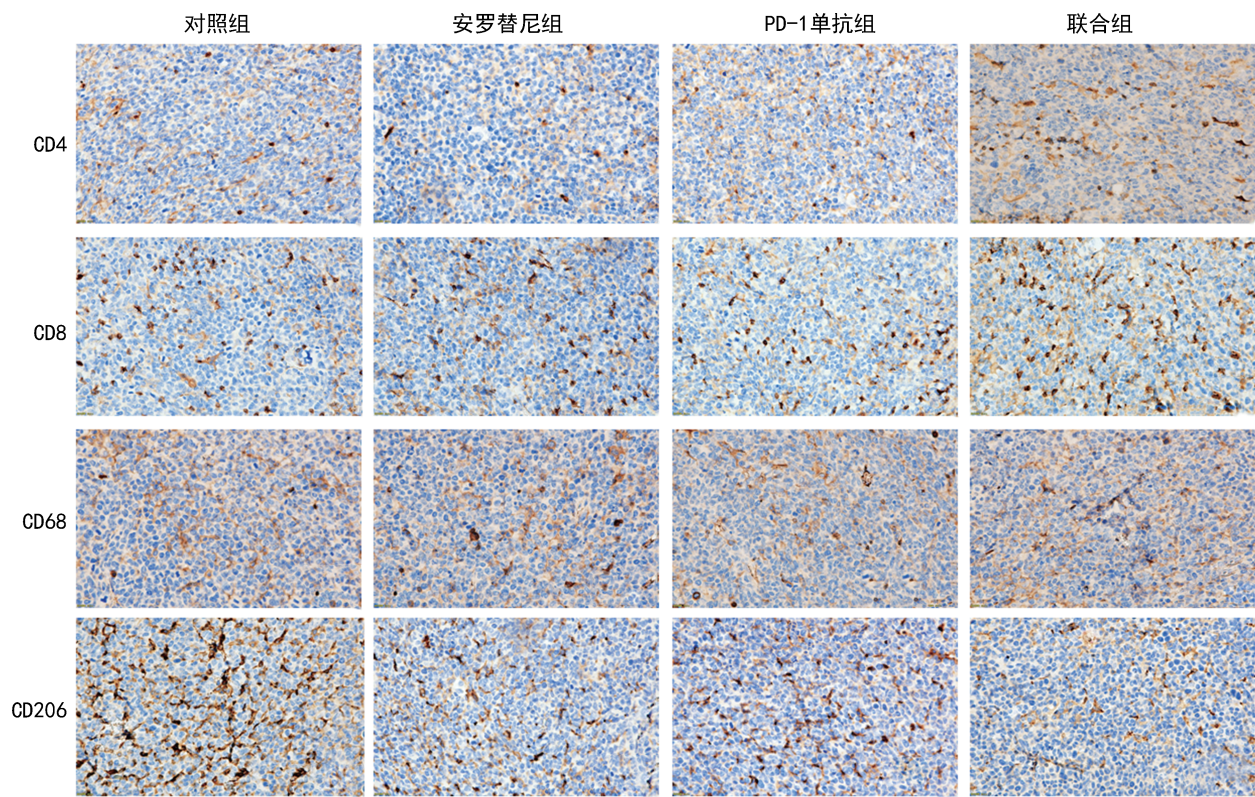
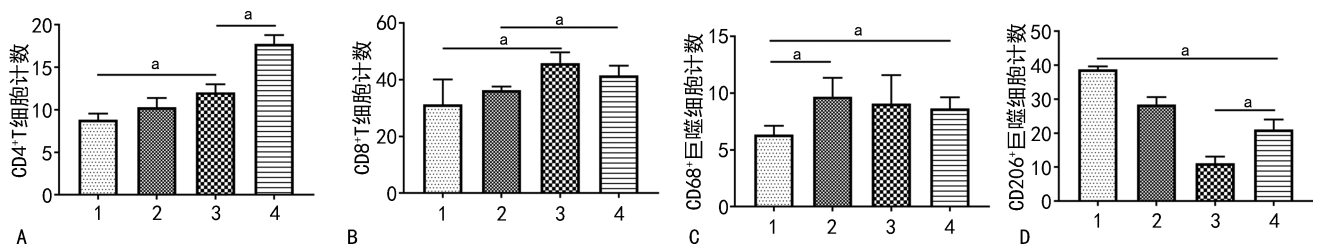
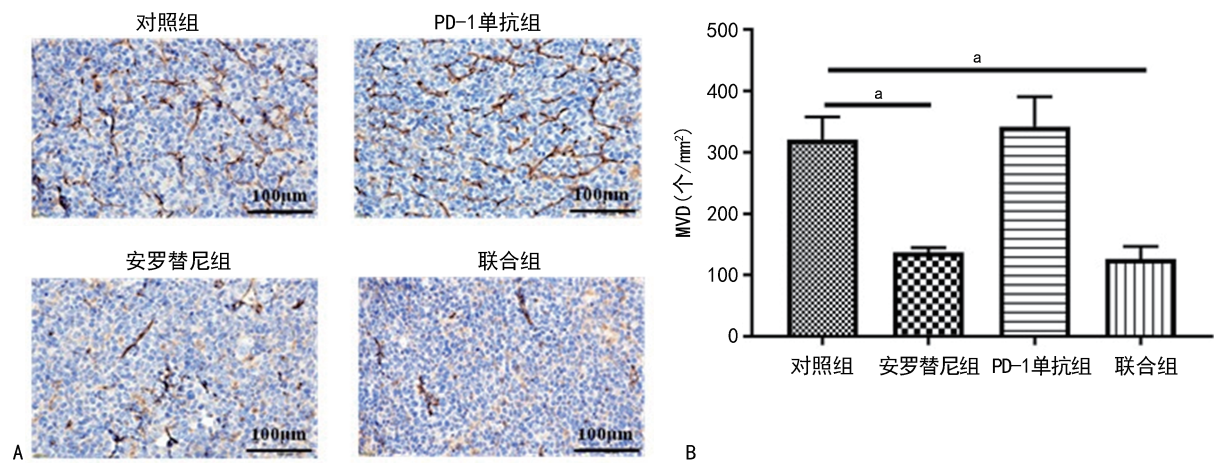


图 2 各组 LLC 小鼠移植瘤组织 CD4、CD8、CD68、CD206 染色浸润代表图(免疫组织化学染色,200×)



A:CD4⁺ T 细胞计数;B:CD8⁺ T 细胞计数;C:CD68⁺ 巨噬细胞计数;D:CD206⁺ 巨噬细胞计数;1:对照组;2:安罗替尼组;3:PD-1 单抗组;4:联合组;°: $P<0.05$ 。

图 3 各组 LLC 小鼠移植瘤组织 CD4、CD8、CD68、CD206 免疫组织化学染色阳性细胞数



A:CD31(免疫组织化学染色,200×);B:各组 MVD 比较;°: $P<0.05$ 。

图 4 各组 CD31 免疫组织化学染色情况及 MVD 比较

表 1 各组细胞因子免疫荧光信号强度表达情况 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	安罗替尼组	PD-1 单抗组	联合组
IL-1 α	15.20 $\pm$ 4.51	21.83 $\pm$ 7.09	16.27 $\pm$ 5.29	27.89 $\pm$ 22.96
IL-6	236.31 $\pm$ 47.24	259.67 $\pm$ 60.07	291.63 $\pm$ 62.16	314.27 $\pm$ 171.01
CCL5	51.19 $\pm$ 11.96	51.64 $\pm$ 9.85	59.44 $\pm$ 4.17	63.56 $\pm$ 7.28 ^a
VEGF-A	1 259.40 $\pm$ 213.84	1 453.25 $\pm$ 424.24	1 151.89 $\pm$ 198.46	1 257.79 $\pm$ 318.76
TNF- α	157.73 $\pm$ 16.30	153.87 $\pm$ 21.20	155.07 $\pm$ 26.80	152.39 $\pm$ 9.68
GM-CSF	148.08 $\pm$ 19.56	142.75 $\pm$ 21.15	141.12 $\pm$ 23.70	142.56 $\pm$ 17.48
IL-4	187.95 $\pm$ 21.39	204.19 $\pm$ 55.58	182.21 $\pm$ 33.52	179.34 $\pm$ 20.48
IL-3	133.03 $\pm$ 15.26	134.38 $\pm$ 18.30	127.90 $\pm$ 19.33	126.56 $\pm$ 9.90
IL-10	215.60 $\pm$ 22.09	213.15 $\pm$ 29.71	205.70 $\pm$ 45.16	202.85 $\pm$ 14.12
IL-2	131.20 $\pm$ 15.28	123.87 $\pm$ 15.19	126.58 $\pm$ 21.67	122.73 $\pm$ 14.65
IL-12 p70	245.36 $\pm$ 31.22	245.18 $\pm$ 41.82	233.34 $\pm$ 46.64	228.52 $\pm$ 22.78
IL-9	245.10 $\pm$ 72.33	252.06 $\pm$ 74.47	233.79 $\pm$ 86.39	227.55 $\pm$ 50.14
IL-5	184.77 $\pm$ 18.18	195.92 $\pm$ 45.45	180.21 $\pm$ 33.59	170.33 $\pm$ 25.83
IL-1 β	171.72 $\pm$ 31.82	173.19 $\pm$ 25.79	167.03 $\pm$ 38.42	157.57 $\pm$ 12.03
INF- γ	199.16 $\pm$ 33.24	187.39 $\pm$ 14.13	183.57 $\pm$ 32.51	181.79 $\pm$ 20.40
CCL2	222.47 $\pm$ 40.68	213.68 $\pm$ 38.27	209.35 $\pm$ 61.85	202.65 $\pm$ 27.12
IL-17A	180.37 $\pm$ 26.50	172.49 $\pm$ 21.14	164.26 $\pm$ 21.59	163.83 $\pm$ 19.53
IL-13	37.42 $\pm$ 6.22	27.36 $\pm$ 2.92 ^a	32.71 $\pm$ 9.05	32.56 $\pm$ 4.80
M-CSF	34.80 $\pm$ 8.24	22.51 $\pm$ 3.83 ^a	32.13 $\pm$ 12.40	29.78 $\pm$ 6.40
CXCL1	105.09 $\pm$ 46.12	113.61 $\pm$ 80.59	65.52 $\pm$ 32.77	57.75 $\pm$ 29.44 ^a

^a: $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

在晚期恶性肿瘤的治疗中,抗血管生成治疗和以 ICI 为代表的免疫治疗都具有举足轻重的地位,而二者的联合也在晚期 NSCLC、肝癌、结直肠癌、宫颈癌等临床治疗中取得了明显疗效,对不能耐受化疗、拒绝化疗或多线治疗进展的患者提供了一种无化疗的可选方案。目前,二者联合治疗已经应用于晚期 NSCLC 二线后乃至初治患者中。在一项阿帕替尼联合 SHR-1210 的 II 期临床研究中,晚期经治非鳞 NSCLC 患者联合治疗的客观缓解率(objective response rate, ORR)和疾病控制率(disease control rate, DCR)分别为 30.80%和 82.44%,中位无进展生存期可达到 5.9 个月^[11]。2019 年韩宝惠教授在世界肺癌大会上报道了安罗替尼联合信迪利单抗的多队列 I 期临床试验,该联合方案在初治晚期 NSCLC 患者中总生存期达到 26.2 个月,ORR 与 DCR 分别为 30%和 77%,显示出较好的抗肿瘤协同作用^[12]。此外,2020 年在美国临床肿瘤学会大会上也报道了一项安罗替尼的真实世界研究,安罗替尼联合包括纳武利尤单抗、派姆单抗在内的 PD-1 单抗治疗晚期 NSCLC 的无进展生存期可达到 8 个月^[13]。一项 III 期临床试验 IMpower150 研究(NCT02366143)数据显示,免疫治疗联合抗血管生成治疗可带来更长的无进展生存期和总生存期,其中亚组分析提示转移性患者、EGFR 阳性患者、ALK 阳性患者、KRAS 突变患者可能更受益^[14-18]。正是由于上述一系列的临床结果,2020 年我国《晚期非小细胞肺癌抗血管生成药物治疗中国专家共识(2020 版)》正式发布^[19],该共识结合荟萃分析、真实世界数据和临床实践,指出对于二线后、特殊人

群、伴脑转移的非鳞 NSCLC 及老年 NSCLC 患者,抗血管生成药物联合免疫方案将成为晚期 NSCLC 的一线治疗的新方向。

除了临床上的明显疗效,抗血管生成治疗联合 ICI 的相关作用机制也受到研究者的广泛关注。研究表明,缺氧条件下 VEGFR2 表达的增加可以促进肿瘤血管生成^[6]。由于代偿机制,抗血管生成单药无法根除肿瘤^[20];恶性肿瘤引发组织缺氧伴随血管内皮生长因子表达增高,会加剧肿瘤局部微环境的免疫抑制,使得调节性 T 细胞、骨髓来源的抑制性细胞、肿瘤相关巨噬细胞等免疫抑制细胞水平升高,CD8⁺ T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞等水平下降^[21]。因此,将抗血管生成药物与 ICI 联合可形成正反馈效应:一方面能够使肿瘤血管正常化及重塑,逆转免疫抑制状态;另一方面,ICI 可促进激活的 T 细胞浸润及杀伤肿瘤,上调 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)促进肿瘤血管正常化,使得互相增效获得更好的临床疗效。众所周知,抗血管生成治疗药物根据作用机制可分为以贝伐珠单抗为代表的单抗类、以恩度为代表的血管内皮抑制素及众多 VEGFR 小分子抑制剂;同时,ICI 的治疗药物也有作用于 PD-1 和 PD-L1 不同位点的抗体,那么这些药物的不同组合是否会产生不同的机制效应,目前尚没有研究报道。

为进一步明确安罗替尼与 PD-1 单抗联合治疗的效果及其机制,本研究对 LLC 小鼠进行了联合治疗,结果显示,联合组肿瘤质量较对照组和 PD-1 单抗组明显缩小($P<0.05$),较安罗替尼组也有缩小但差异无统计学意义($P>0.05$),表明安罗替尼可明显增强 PD-1 单抗的治疗效果。由于免疫相关淋巴细胞在抗

肿瘤免疫中发挥关键作用,本研究进一步对各组的主要免疫相关淋巴细胞进行了检测,结果发现 $CD4^{+}T$ 细胞的变化尤为明显,联合组 $CD4^{+}T$ 细胞的数量明显高于其他各组。 $CD4^{+}T$ 细胞是重要的抗肿瘤免疫细胞,既往研究显示, $CD4^{+}T$ 细胞不仅具有辅助性 T 细胞的功能,还有延迟性的细胞毒活性^[22]。同样, $CD8^{+}T$ 细胞在各治疗组均有升高,而且联合治疗组的 $CD8^{+}T$ 细胞的数量明显高于其他各组。此外,巨噬细胞在各治疗组均有不同程度增多,而 M2 型巨噬细胞明显减少。由此可见,安罗替尼和 PD-1 单抗影响了肿瘤免疫微环境,联合治疗后 $CD4^{+}T$ 细胞和 $CD8^{+}T$ 细胞数量的增多,以及巨噬细胞 M1 型转化 M2 型的抑制可能是联合治疗抗肿瘤疗效的关键所在。本研究还对联合治疗抗血管生成作用进行了验证,结果发现联合组与安罗替尼组治疗的抗血管生成作用基本一致,并未因为 ICIs 的加入而减弱其抗血管生成的作用,而抗血管生成药物能够协同并加强免疫治疗的疗效已早有证实^[23]。因此,从总体来看,联合治疗明显改善了微环境。

细胞因子在调节细胞生长、损伤修复等过程中发挥多种生物学功能。在肿瘤发展过程中,细胞因子不仅可以是免疫细胞的产物,也可作为肿瘤与免疫细胞之间的信息载体影响肿瘤免疫细胞。对细胞因子分析可从另一方面评价免疫治疗的效果。本研究发现,安罗替尼联合 PD-1 单抗治疗可改变机体的免疫状态,表现为联合治疗后 CCL5 有明显升高,而 CXCL1 明显下降。CCL5 升高在免疫细胞的趋化和活化中发挥作用,可增强抗肿瘤免疫反应^[24]。MOWAT 等^[25]在 DNA 错配修复基因表达缺失的肠癌研究中也发现 CCL5 作为干扰素依赖性趋化因子,以及 CXCL10 的过度表达可导致系统性而非局部性 $CD8^{+}T$ 细胞优先募集和保留到肿瘤上皮中。而 CXCL1 的降低可以抑制髓样细胞的迁移^[26],同时促进 $CD8^{+}T$ 细胞在肿瘤部位积聚。CCL5 和 CXCL1 的变化,可能是肿瘤组织中 $CD8^{+}T$ 细胞浸润增多、安罗替尼增强 PD-1 单抗免疫治疗作用的重要机制。

综上所述,安罗替尼联合 ICIs 可能通过调节细胞因子 CCL5 和 CXCL1 及增加肿瘤浸润 $CD4^{+}T$ 细胞、 $CD8^{+}T$ 细胞来有效地抑制小鼠移植瘤的生长,该结果可为进一步制订有效的临床治疗策略提供依据。本研究仍有一定的局限性,由于是小鼠肺癌的动物实验,样本量也偏少,对人体的联合治疗作用机制仅供参考,今后还需进行人类肿瘤细胞实验和肺癌临床试验来验证联合治疗的作用机制。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [4] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-590.
- [5] RICCIUTI B, AWAD M M. What is the standard first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer? [J]. Cancer J, 2020, 26(6): 485-495.
- [6] JIANG X, WANG J, DENG X, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 204.
- [7] LI Y, LU J, DENG X, et al. Self-assembling combretastatin A4 incorporated protamine/nanodiamond hybrids for combined anti-angiogenesis and mild photothermal therapy in liver cancer [J]. Nanotechnology, 2021, 32: 46.
- [8] LI S J, CHEN J X, SUN Z J. Improving antitumor immunity using antiangiogenic agents: Mechanistic insights, current progress, and clinical challenges [J]. Cancer Commun, 2021, 41(9): 830-850.
- [9] LIU S, QIN T, LIU Z, et al. Anlotinib alters tumor immune microenvironment by downregulating PD-L1 expression on vascular endothelial cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 309.
- [10] YUAN M, ZHU Z, MAO W, et al. Anlotinib combined with anti-PD-1 antibodies therapy in patients with advanced refractory solid tumors: a single-center, observational, prospective study [J]. Front Oncol, 2021, 11: 683502.
- [11] ZHOU C, WANG Y, ZHAO J, et al. Efficacy and biomarker analysis of Camrelizumab in combination with Apatinib in patients with advanced nonsquamous NSCLC previously treated with chemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(5): 1296-1304.
- [12] CHU T, ZHANG W, ZHANG B, et al. Efficacy and safety of first-line anlotinib-based combinations for advanced non-small cell lung cancer: a three-armed prospective study [J]. Transl Lung

- Cancer Res, 2022, 11(7):1394-1404.
- [13] QIU L, ZHAO X, SHI W, et al. Real-world treatment efficacy of anti-programmed death-1 combined with anti-angiogenesis therapy in non-small cell lung cancer patients [J]. Medicine, 2020, 99(24):e20545.
- [14] SOCINSKI M A, JOTTE R M, CAPPUZZO F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC [J]. N Engl J Med, 2018, 378(24):2288-2301.
- [15] RECK M, MOK T, NISHIO M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial [J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(5):387-401.
- [16] WEST H J, MCCLELAND M, CAPPUZZO F, et al. Clinical efficacy of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in KRAS-mutated non-small cell lung cancer with STK11, KEAP1, or TP53 comutations: subgroup results from the phase III IMpower150 trial [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(2):e003027.
- [17] NOGAMI N, BARLESI F, SOCINSKI M A, et al. IMpower150 final exploratory analyses for Atezolizumab plus Bevacizumab and Chemotherapy in key NSCLC patient subgroups with EGFR mutations or metastases in the liver or brain [J]. J Thorac Oncol, 2022, 17(2):309-323.
- [18] SOCINSKI M A, NISHIO M, JOTTE R M, et al. IMpower150 final overall survival analyses for Atezolizumab plus Bevacizumab and chemotherapy in first-line metastatic nonsquamous NSCLC [J]. J Thorac Oncol, 2021, 16(11):1909-1924.
- [19] 中国临床肿瘤学会血管靶向治疗专家委员会, 中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌专家委员会, 中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌抗血管生成药物治疗专家组. 晚期非小细胞肺癌抗血管生成药物治疗中国专家共识(2020 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(12):1063-1077.
- [20] ZIRLIK K, DUYSER J. Anti-angiogenics: current situation and future perspectives [J]. Oncol Res Treat, 2018; 41(4):166-171.
- [21] RAMJIAWAN R R, GRIFFIOEN A W, DUDA D G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: is there a role for combinations with immunotherapy? [J]. Angiogenesis, 2017, 20(2):185-204.
- [22] CACHOT A, BILOUS M, LIU Y C, et al. Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer [J]. Sci Adv, 2021, 7(9):eabe3348.
- [23] FURUKAWA K, NAGANO T, TACHIYARA M, et al. Interaction between immunotherapy and antiangiogenic therapy for cancer [J]. Molecules, 2020, 25(17):3900.
- [24] BOZIC T, SERSA G, KRANJC B S, et al. Gene electrotransfer of proinflammatory chemokines CCL5 and CCL17 as a novel approach of modifying cytokine expression profile in the tumor microenvironment [J]. Bioelectrochemistry, 2021, 140:107795.
- [25] MOWAT C, MOSLEY S R, NAMDAR A, et al. Anti-tumor immunity in mismatch repair-deficient colorectal cancers requires type I IFN-driven CCL5 and CXCL10 [J]. J Exp Med, 2021, 218(9):e20210108.
- [26] KORBECKI J, BARCZAK K, GUTOWSKA I, et al. CXCL1: gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2):792.
- (收稿日期: 2022-12-19 修回日期: 2023-04-11)
(编辑: 袁皓伟)

(上接第 2408 页)

- [23] BAHOUTH Z, MOSKOVITZ B, HALACHMI S, et al. Allium stents: a novel solution for the management of upper and lower urinary tract strictures [J]. Rambam Maimonides Med J, 2017, 8(4):e0043.
- [24] DALLAS K B, ROGO-GUPTA L, ELLIOTT C S. Urologic injury and fistula after hysterectomy for benign indications [J]. Obstet Gynecol, 2019, 134(2):241-249.
- [25] PYRA K, SZMYGIN M, SZMYGIN H, et al. Uretero-vaginal fistulas: clinical presentation, treatment and literature overview [J]. Ginekolog Pol, 2022, 93(6):501-505.
- (收稿日期: 2023-02-20 修回日期: 2023-06-07)
(编辑: 冯甜)