学校编码：10384　　密级____

学号：24520141153505

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

非小细胞肺癌循环肿瘤细胞 PD-L1 蛋白检测

Detection of PD-L1 protein in circulating tumor cells of Non Small Cell Lung Cancer

吴晓婷

指导教师姓名：　安汉祥

专 业 名 称：　肿瘤学

论文提交日期：　2017 年 4 月

论文答辩日期：　2017 年 5 月

答辩委员会主席：_____

评　　阅　　人：_____

2017 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为(　　)课题(组)的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

背景现状及研究的目的意义

目前，肺癌位居全世界死亡率和发病率很高的恶性肿瘤之一。按病理组织学，分为小细胞肺癌（small cell lung cancer，SCLC）和非小细胞肺癌（non small cell lung cancer，NSCLC），其中大约 80%是 NSCLC。由于 NSCLC 早期的临床症状和体征不明显，大概 2/3 的 NSCLC 患者在确诊时就已经失去手术根治的机会。由于传统的化疗药物和放疗治疗不能获得很好的疗效，NSCLC 自诊断之后的 5 年生存率只有 10% - 15%。因此选择合适高效的的治疗方式实施个体化的治疗模式，成为目前肿瘤治疗领域的主要发展方向。

近年来，伴随着精准医疗（precision medicine）理念登上医学治疗领域的舞台，程序性死亡分子 1 (programmed cell death-1，PD-1) /程序性死亡分子配体 1 (programmed cell death-1 ligand，PD-L1)逐渐成为医学免疫治疗领域广受关注的治疗靶点。PD-1 / PD-L1 通过免疫逃逸、抑制免疫应答、杀伤等方式，增强了肿瘤微环境的抵抗作用。随着对 PD-1/PD-L1 信号通路系统在 NSCLC 发生发展机制研究的突破，人们渐渐开启了对 PD-1/PD-L1 免疫检查点特异性阻滞剂的临床研究应用，其中以 nivolumab，pembrolizumab 为先锋的抗 PD-1 单抗进入了多项临床研究，并且在晚期 NSCLC 患者中取得显著的生存获益。大量相关的医学临床研究均表明 PD1/PD-L1 免疫抑制剂让 PD-L1 表达阳性的 NSCLC 患者明显获益。

考虑到高昂的费用和该制剂的毒副作用，我们迫切需要有效的检测方法来帮助我们快速地区分和筛选出对该制剂有效的优势人群。然而原发肿瘤组织标本的检测存在原发肿瘤病灶和转移病灶之间的异质性问题，即原发肿瘤病灶并不能完全反映转移病病灶乃至全身肿瘤负荷的生物特性。同时，无论是原发病灶还是转移病灶，为了获得 PD-L1 蛋白的表达情况，均需要进行活检穿刺标本进行相关的靶点检测。穿刺的有创性以及病人难以耐受等原因常常导致实施检测的难度。此外，据很多相关研究报道，从原发肿瘤病灶脱落的肿瘤细胞在发生进展过程中经历着基因的变异以及蛋白表达的变异，因此，实施肿瘤组织基因的动态检测有助于对疾病发生发展的理解和研究，也有助于及时发现新出现

厦门大学博硕士论文摘要库

的最新靶点，从而有助于临床工作者提出切实可行的治疗方案。

因此，围绕着解决这一系列问题，本次课题探讨检测 NSCLC 循环肿瘤细胞 （circulating tumor cell，CTC）PD-L1 的可行性。CTC 的概念是在 1869 年由澳大利亚籍学者 Ashworth 第一次提出。在 1976 年 Nowell 将 CTC 的定义修正为：来源于原发肿瘤病灶或转移的肿瘤灶，获得脱离基底膜的能力并通过入侵组织基质进入血管内的肿瘤细胞。目前的 CTC 概念是指，存在于外周血中所有肿瘤细胞的统称。脱落进入血液里的肿瘤细胞，大部分会被吞噬消灭，而仅有少部分会生存下来并聚集为集落，在最后形成肿瘤的转移病灶。因此，CTC 和转移病灶的形成密切相关，而致使肿瘤患者死亡的最主要的原因常常是肿瘤的转移。原发肿瘤可以产生多个转移病灶，而多个转移病灶就有可能具有不同的生物信息和特征，因此 CTC 就在一定程度上反映了从原发肿瘤病灶到转移肿瘤病灶的比较全面的生物信息，就仿佛是绘制了一幅全身各部分肿瘤病灶的图谱，反映各部位的生物学信息。这些信息有助于临床工作者针对患者的全身系统寻找到合适的药物靶点。

本次课题就旨在探讨强生公司生产的被 FDA 唯一批准的可用于 CTC 检测的仪器（Cellsearch）对 NSCLC 病人 CTC 中 PD-L1 蛋白进行检测的可行性。由于标本的容易获得，也能做到实时动态监测。到目前为止，关于癌症病人 CTC 中 PD-L1 蛋白的检测全球鲜有报道。本研究有助于开拓 CTC 液体活检的领域，为临床治疗提供新的检测方法。

方法

应用实时荧光 PCR 法（Real-time PCR，qRT-PCR ）检测 PD-L1 在 mRNA 水平不同表达梯度的肺癌细胞系，然后用流式细胞仪验证 PD-L1 蛋白在蛋白水平的表达情况。将相应的肿瘤细胞计数后加入健康人血液，用 Cellsearch 进行检测，证实了 Cellsearch 对循环肿瘤细胞中 PD-L1 蛋白进行检测的可行性。进一步明确选出最佳的抗体和相应的最佳抗体浓度。最后，通过筛选获得的肺癌细胞系，得到相应的 PD-L1 不同表达强度的阳性信号参照标准。建立完善方法后，对 20 例 NSCLC 患者进行了 CTC 以及 CTC 中 PD-L1 蛋白的检测。

厦门大学博硕士论文摘要库

结果

Real-time PCR 实验显示 PD-L1 mRNA 水平在 A549、PC-9、H1975 细胞中分别呈低、中、高表达，流式细胞仪验证了 PD-L1 在蛋白水平的表达情况以及所使用的抗体的特异性。用上述细胞系加入健康人血液中进行 Cellsearch 检测，这三株细胞系中的大部分细胞在不同的程度表达 PD-L1，与 PCR 和流式检测结果一致。应用建立的方法对 20 例 NSCLC 血液检测发现，有 10 例检测到 CTC，阳性检测率为 50%，CTC 的计数范围是 1-15。在 CTC 检测阳性的病人中，CTC 中 PD-L1 表达阳性的病人有 6 例，CTC 中 PD-L1 检测到的阳性率为 60% ；对于单个病人而言，CTC 的检测率波动在 0%-100%，PD-L1 阳性的 CTC 计数范围波动在 0-8。统计分析结果显示肺癌病人性别、年龄、临床分期、组织学分型、吸烟与否、病理分级等临床特征与是否检测到 CTC 以及 CTC 中 PD-L1 的表达没有显著相关性。

结论

本研究首次证实 NSCLC 患者 CTC 中 PD-L1 蛋白检测的可行性，为临床实时动态检测 PD-L1 提供新的检测方法，有助于临床肿瘤患者的个体化治疗。

关键词：非小细胞肺癌；循环肿瘤细胞 ；Cellsearch ；程序性死亡配体（PD-L1）

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Background and Objective

Lung cancer ranks top one of the most common malignances in the world. According to the histopathological classification, it can be divided into two types: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Small Cell Lung Cancer (SCLC). Almost 80% of lung cancer is consisted of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Immune checkpoint regulators like PD-L1 have become new targets leading to obvious remissions in patients with advanced NSCLC. However, in view of the expensiveness and toxicity side effects of these therapies, we need to find helpful methods and predictive biomarkers to select responders for immunotherapy. A great deal of researches has proved that patients with high PD-L1 expression relieved a lot from anti-PD-L1/PD-1 therapies. Many studies reported the heterogeneity of primary tumor and metastasis, which means primary tumor can not provide adequate molecular information for determining PD-L1 expression in metastatic sites. However, biopsy of metastatic sites is an invasive procedure and is difficult to be accepted in the clinic. To overcome such problems, we applied Circulating Tumor Cell （CTC） of "liquid biopsy" in this study to detect PD-L1 on CTC in blood of NSCLC patients. This study aims to test the possibility for new detection method of PL-L1 on CTC of NSCLC. CTC isolated from the peripheral blood can reflect the molecular information of primary tumor and different metastatic sites and may give a real-time molecular information of the whole tumor of patients. The established CTC/PD-L1 detection method can be used in future clinical trials for selection and monitoring of cancer patients taking immune checkpoint inhibitors.

厦门大学博硕士论文摘要库

Methods

We used quantitative real time PCR (qRT- PCR) to examine Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell lines which express PD-L1 in different extent. Then we validated PD-L1 expression protein level and specificity of PD-L1 antibody used in our study by flow cytometry. Finally, we selected the optimal antibody and established immunoscore criteria for PD-L1 expression on lung cancer cell lines with Cellsearch -- a FDA approved method of detecting CTC. At last, we analysed 20 patients with NSCLC admitted in the 1st affiliated hospital of Xiamen University to perform CTC detection and PD-L1 expression on CTC by Cellsearch.

Results

The results of qRT- PCR showed A549, PC-9 and H1975 express increased PD-L1 respectively. Flow cytometry validated the PD-L1 expression of NSCLC cells. Meanwhile, it proved the availability and specificity of selected PD-L1 antibody used in our study. Finally, we choosed the antibody from BD company and established immunoscores for PD-L1 expression on single tumor cells by NSCLC cell lines which show different ranges of PD-L1 expression with Cellsearch. Among 20 patients analysed in this study, 10 patients were CTC positive, with 50% detection rate. The number of CTC ranged from 1 to 15. Among 10 patients with CTC positive, we found PD-L1 expression on CTCs in 6 patients. The fraction of PD-L1 (+) CTC varied from 0 to 100% in individual patients. The number of PD-L1 (+) CTC ranged from 0 to 8 cells. Statistical analasis results showed there was no significant correlation between CTC detection and patients' clinical data like gender, age, TNM stage, histological classification, smoking history and pathology grade. There was also no significant correlation between PD-L1 of CTC and patients' clinical data.

厦门大学博硕士论文摘要库

Conclusions

This study clarified, for the first time, the possibility to detection of PD-L1 on CTCs in NSCLS patients with Cellsearch. Our study could provide a new analysis tool for dynamic detection of PD-L1 expression. Performing these liquid biopsy anlysis into future clinical trials of checkpoint blockade might not only be useful for therapy selection but also provide information of CTC analysis performed before and during the therapy.

Key words: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); Circulating Tumor Cell (CTC); Cellsearch; PD-L1

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

中文摘要 I

英文摘要 IV

前言 1

第一部分　理论基础 3

1. NSCLC 概述 3

2. PD-1/PD-L1 信号通路与 NSCLC 4

2.1 免疫检查点分子与肿瘤的免疫逃逸 4

2.2 PD-1/PD-L1 信号通路及其生物特性 5

2.3 PD-1/PD-L1 抑制剂在 NSCLC 中的临床研究进展 6

3. CTC 简介及其研究进展 8

3.1 CTC 简介 8

3.2 CTC 检测的临床意义及优势特点 9

3.3 CTC 检测的方法概述 10

4. CTC 中 PD-L1 蛋白检测的意义和研究进 11

第二部分　材料和方法 13

1. 实验材料及试剂 13

1.1 实验材料 13

1.2 主要仪器、设备、试剂及材料 13

2. 实验方法 15

2.1 肺癌细胞株的培养 15

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2 RT - PCR 法测定对比肺癌细胞株中 PD-L1 的表达量 17
2.3 流式细胞仪验证抗体特异性及 PD-L1 在不同细胞系的表达 21
2.4 用 Cellsearch 检测肺癌不同肺癌细胞株中 PD-L1 的表达量 22
2.5 用 Cellsearch 对纳入的 NSCLC 病人的 CTC 以及 CTC 中 PD-L1 蛋白进行检测检测病人标本.....24
第三部分 实验结果 28
1. NSCLC 患者一般临床资料统计 28
2. 不同肺癌细胞系中 PD-L1 在 m-RNA 表达水平的检测对比 28
3. 不同细胞系用流式进行检测对比 30
4. 肺癌细胞系加入健康人血液 Cellsearch 机检测结果 33
5. 纳入的非小细胞肺癌病人的标本上 Cellsearch 检测结果 35
6. 对肺癌病人的临床病理特征和 CTC 以及 CTC 中 PD-L1 蛋白表达之间的相关性分析 38
第四部分 讨论和结论 41
1. 讨论 41
2. 结论 44
附 录（英文缩略词表） 45
参考文献 47
致 谢 53

厦门大学博硕士论文摘要库

Table Contents

Chinese Abstract ..... Ⅰ

English Abstract ..... Ⅳ

Preface 1

PART 1 Theory Introduction 3

1.Summary of NSCLC. 3

2.PD-1/PD-L1 Pathway and NSCLC. 4

2.1 Immune Check Point Moleculars and Tumor Escape 4

2.2 Biological Characteristcis of PD-1/PD-L1 Signal 5

2.3 Clinical Research Progress of PD-1/PD-L1 Inhibitors 6

3. CTC Introduction and Research Progress 8

3.1 Introduction of CTC 8

3.2 Clinical Significance and Superiorities of CTC 9

3.2 Methods Review of CTC Detection 10

4. Significances and Research Progress of CTC Detecion 11

PART 2 Materials and Methods 13

1.Materials and Reagents 13

1.1 Materials 13

厦门大学博硕士论文摘要库

1.2 Main Instruments and Reagents.....13

2. Methods 15

2.1 Cell Culture of Lung Cancer Cell Lines.....15

2.2 Detection of PD-L1 of Lung Cancer Cell Lines by PCR.....17

2.3 Detection of PD-L1 of Lung Cancer Cell Lines by Flow Cytometry.....21

2.4 Detection of PD-L1 of Lung Cancer Cell Lines by Cellsearch.....22

2.5 Detect PD-L1 of CTC of Patients with NSCLC 24

PART 3 Experiment Results 28

1. Clinical Data of Patients with NSCLC 28

2. Comparison of PD-L1 Expression of Cell Lines with q-RT PCR 28

3. Comparison of PD-L1 Expression of Cell Lines with Flow Cytometry.....30

4. Comparison of PD-L1 Expression of Cell Lines with Cellsearch 33

5. Detect PD-L1 of CTC of Patients with NSCLC.....35

6. Statistical Analysis of Patients Data with CTC and PD-L1 of CTC.....38

PART 4 Discussion and Conclusion 41

1. Discussion.....41

2. Conclusion.....44

Appendix English abbreviation Thesaurus.....45

Reference.....47

厦门大学博硕士论文摘要库

Aknowledgements 53

厦门大学博硕士论文摘要库

前 言

肺癌作为世界上最常见的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率日渐上升，并且已经成为全世界发病率与死亡率最高的恶性肿瘤之一。我国肺癌的发病率和死亡率均居于恶性肿瘤之首，分别高达 53.57/10 万和 45.57/10 万，严重威胁着国民的健康。肺癌按照病理组织学分类，可以分为非小细胞肺癌（non small cell lung cancer, NSCLC） 和小细胞肺癌（Small Cell Lung Caner，SCLC）[1]。其中大约 80%-85%是 NSCLC，约 70%的 NSCLC 患者就诊时就一般处于中晚期[2, 3]，而失去了手术的机会，只能采取以化疗为基础的综合治疗，然而单纯的化疗并没有获得显著的疗效。

近年来，随着肿瘤免疫检查点研究的迅猛发展，人体的免疫治疗靶点引起学者们的广泛关注[4]。人体的免疫系统具有免疫监视并清除肿瘤细胞的作用。因此，机体的免疫系统在肿瘤的发生、发展过程中扮演着尤其重要的角色。

随着肿瘤免疫检查点的深入研究，程序性死亡分子 1（programmed cell death 1, PD-1）/程序性死亡分子配体 1（programmed cell death-ligand 1, PD-L1） 已经成为广受关注的免疫治疗靶点。研究[5]显示 PD-1/PD-L1 信号通路被激活，可诱发免疫抑制性肿瘤微环境形成，使肿瘤细胞获得逃避机体免疫监视与杀伤的能力。如果 PD-1/PD-L1 信号通路被阻断，肿瘤的免疫微环境被逆转，内源性抗肿瘤免疫效应便加强。目前，PD-1/PD-L1 信号通路免疫检查点阻滞剂如抗 PD-1、抗 PD-L1 抗体由于其显著的特异性、较小的毒副作用、肿瘤被控制时间较长等优点，逐渐成为肿瘤治疗新的方向。这类免疫检查点抑制剂在近几年的临床试验中连续获得了突破性的进展[6, 7]。

较多的临床医学研究表明 PD-L1 表达阳性的的患者对抗 PD-1/PD-L1 单抗疗效显著。一项单独使用治疗 NSCLC 的Ⅰ期临床试验（KEYNOTE-001）的研究表明，抗 PD-1 单抗抑制剂 pembrolizumab 的毒副作用可被绝大多数患者接受，且不良事件反应率较低，晚期的 NSCLC 患者对该类抑制剂耐受良好。该研究同时表明，肿瘤组织高度表达 PD-L1 的患者疗效改善明显[8]。

大量研究表明肿瘤患者的原发肿瘤病灶和转移病灶在生物学上存在着异质性，即原发病灶并不能完全地反映转移病灶的生物学特征和信息。同时，穿刺获

厦门大学博硕士论文摘要库

得肿瘤标本进行 PD-L1 检测面临着有创，病人难以接受等不便。围绕该问题的解决，本课题引入了最近几年受大家热议的液体活检概念中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)。

CTC 是指从原发病灶脱落进入外周血的肿瘤细胞，在肿瘤的转移中扮演着非常重要的角色[9]。最近几年兴起发展的用于外周血中识别检测 CTC 的技术已经证实了 CTC 作为液体活检的潜在价值，尤其是对于肺癌等这种组织标本的获取非常困难的实体瘤患者[10, 11]。

有前期研究利用 Cellsearch--全球唯一被 FDA 认证通过的用于检测 CTC 的仪器证实了 PD-L1 频繁的表达于 HR(+)，HER2(-)的乳腺癌患者的 CTC 中。这是全球首例在乳腺癌 CTC 中检测到 PD-L1 的报道。被检测到 PD-L1 表达的 CTC 意味着这些有 CTC 的患者可能存在阻断抑制免疫系统的能力。而这些被检测到的 CTC 也在一定程度上反映了转移病灶的生物学信息，可作为除原发病灶外的可用于抗 PD-L1 治疗的潜在靶点，它们所提供的信息和血浆中测到的 PD-L1 是不同的，因为这些无法提供肿瘤细胞来源的 PD-L1 表达[12]。

因此，对于 NSCLC 患者 CTC 中 PD-L1 蛋白表达情况的检测将具有里程碑式的意义，只需检测外周血液，就可完成病人的筛查。此外，标本的易获得性也使得实时动态检测能成为现实，提供方便有效的动态检测方法。快速筛选出对抗 PD-1/PD-L1 单抗有效的潜在优势人群，减轻病人经济负担的同时也避免了抗 PD-1/PD-L1 单抗对无效人群的毒副作用，避免耽误最佳治疗时机。有助于开拓液体活检在肿瘤免疫治疗领域的应用，为未来的肿瘤免疫治疗带来新的启示和希望。

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”. Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库