



· 综述 ·

肿瘤免疫治疗成像技术的研究进展

许金霞¹, 唐建斌²

1. 浙江大学医学院附属儿童医院放射科, 浙江 杭州 310003;

2. 浙江大学化学工程与生物工程学院生物纳米工程中心, 浙江 杭州 310027

[摘要] 由于传统的影像学技术难以满足肿瘤免疫治疗的临床需求, 目前亟待开发新的免疫影像学技术来示踪免疫细胞和评价免疫治疗效果。本文综述了免疫PET、CT、MRI、光学成像及多模式成像的最新研究进展, 虽然基于各种新型探针的免疫成像技术获得了巨大进步, 但是仍需进一步验证它们的安全性和有效性, 才能获得可进入临床应用的免疫成像技术。

[关键词] 肿瘤; 免疫治疗; 影像技术; 生物探针

DOI: 10.19732/j.cnki.1008-617X.2018.05.018

中图分类号: R730.51 文献标志码: A 文章编号: 1008-617X(2018)05-0426-05

Advances in imaging technologies for cancer immunotherapy XU Jinxia¹, TANG Jianbin² (Department of Radiology, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China; 2. Center for Bionanoengineering, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang Province, China)

Correspondence to: TANG Jianbin E-mail: jianbin@zju.edu.cn

[Abstract] Since the traditional imaging technologies cannot meet the demands from immunotherapy, new imaging technologies are highly desired to track immune cells and evaluate the efficacy of immunotherapy. This review summarizes the advances in PET, CT, MRI, optical and multimodal imaging for cancer immunotherapy. A large number of new imaging technologies with novel probes have been reported for immunotherapy, but further research needs to be done to validate their safety and effectiveness before they enter into clinical applications.

[Key words] Tumor; Immunotherapy; Imaging technology; Bioprobe

1 肿瘤免疫治疗

肿瘤免疫治疗是指通过免疫系统的被动或主动免疫来控制 and 杀灭肿瘤的一种治疗方法。与传统医疗手段在物理和化学层面上杀灭肿瘤细胞不同, 肿瘤免疫疗法通过增强机体免疫系统功能来控制 and 杀灭肿瘤, 具有不良反应小、特异性强等优点^[1]。根据治疗原理的不同, 免疫疗法主要可分为非特异性免疫刺激、肿瘤疫苗、过继细胞疗法 (adoptive cell transfer therapy, ACT) 及免疫检查点抑制剂等。其中, ACT和免疫检查点抑制剂是当前最主流的免疫疗法。以嵌合抗原受体T细胞免疫疗法 (chimeric antigen receptor T

cell immunotherapy, CAR-T) 和肿瘤特异性T细胞受体改造的T细胞 (T cell receptor engineered T cell, TCR-T) 疗法为代表的ACT, 能够通过识别肿瘤抗原特异性杀伤多种肿瘤细胞, 已被多项临床试验证实具有非凡的抗癌效果。CAR-T细胞治疗药物Kymriah已被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准在临床上治疗白血病^[2]。免疫检查点抑制剂疗法是指通过抑制免疫检查点蛋白, 激活免疫系统杀伤肿瘤的一种免疫疗法^[3]。目前, 研究最多的免疫检查点靶点为溶细胞性T淋巴细胞相关抗原4 (cytolytic Tlymphocyte-associated antigen 4,

基金项目: 国家自然科学基金委优秀青年基金项目 (51522304); 国家自然科学基金面上项目 (21774109)。

通信作者: 唐建斌 E-mail: jianbin@zju.edu.cn

CTLA-4)和细胞程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)/程序性死亡受体的配体1(programmed death ligand 1, PD-L1),靶向它们的单克隆抗体已被证明具有很好的抗肿瘤效果。FDA已批准了CTLA-4、PD-1及PD-L1的抗体用于治疗晚期黑色素瘤、小细胞肺癌和转移性膀胱癌等^[4]。

2 肿瘤成像技术的发展

影像学技术是癌症研究和临床诊断必不可少的工具。过去几十年中出现了大量新的影像学技术并获得了广泛应用。传统的影像学技术只能让临床医师看到体内肿瘤的位置和形貌,今后的影像学技术还将获知肿瘤内分子、细胞和生物过程,从而为肿瘤诊断提供全方位信息。影像系统复杂多样,其驱动能源可以为X线、正电子、光子和声波。根据空间分辨率,可以分为宏观、介观和微观成像。宏观成像系统提供解剖和生理信息,已广泛用于临床和临床前研究,包括CT、MRI和超声;新兴分子成像系统包括PET/CT、SPECT及荧光成像等只有少量临床和临床前应用,大部分尚待进一步研究。另外,多种成像方式结合的多模式成像也在快速发展^[5]。

3 免疫治疗成像技术的研究进展

无论是临床前还是临床阶段,通过无创成像技术及时评价肿瘤对治疗的响应、对成功研发和实施免疫治疗至关重要。免疫治疗成像主要用来追踪免疫细胞在体内的分布过程和评价免疫治疗的效果和不良反应等。以下介绍免疫PET、CT、MRI、光学成像及多模式成像等免疫成像技术的最新进展。

3.1 免疫PET

免疫PET是一种先进的分子成像技术,可以监控免疫治疗后的免疫细胞转运和治疗效果。然而,PET空间分辨率较低,临床与临床前使用的扫描装置空间分辨率大约分别是1.83 mm和0.67 mm,难以实现微小结构成像。最近,科学家们发明了一些新的PET成像试剂,并用于一些疾病模型的免疫治疗研究中。例如,Keu等^[6]发明了一种PET成像示踪剂9-[4-(¹⁸F)氟-3-(羟甲基)丁基]鸟嘌呤,用来追踪表达1型单

纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶和IL-13-zetakine CAR的工程化CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)。这种示踪剂在实时追踪CTL以评价胶质瘤治疗效果方面安全有效。免疫PET成像也用于评估针对肿瘤细胞表面标记的抗体药物的药代动力学^[7]。Maute等^[8]研发了6种PET放射性标记的PD-1变体,即编码一致的高亲和力细胞死亡蛋白(HAC-PD1)示踪剂,用于实现对PD-L1表达的成像,而PD-L1与癌症的免疫检查点相关,这使得肿瘤早期检测成为可能,同时也为筛选PD-L1抗体治疗肿瘤提供了一种影像学方法。与之相似,PD-1胞外域蛋白也是一种PD-L1拮抗剂,与传统的抗PD-L1抗体相比,其穿透肿瘤的能力及药代动力学均明显改善,经过PET放射性标记也可用于体内追踪PD-L1的表达。Tavaré等^[9]制备了一种⁸⁹Zr-去铁敏标记的抗CD8半胱氨酸交联-双特异抗体PET造影剂,并用它追踪体内产生的CD8⁺T淋巴细胞,用于监控抗原特异性ACT、激活抗体治疗(抗CD137/4-1B13)以及免疫检查点阻断抗体治疗(抗PD-L1)等免疫疗法的响应性。CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞等免疫细胞在调节免疫方面发挥重要作用,检测CD4⁺T淋巴细胞对监控肿瘤的免疫治疗具有重要意义。Freise等^[10]制备了一种PET放射性标记的抗鼠CD4抗体片段,发现其能有效追踪淋巴结和脾脏中的CD4⁺T淋巴细胞。Li等^[11]利用硫酸羟基丁二酰亚胺(NHS)-生物素-链霉亲和素法标记CD8⁺T淋巴细胞,然后利用⁸⁹Zr-去铁敏-生物素在PET下追踪ACT时的CTL。研究者还制备了一种⁸⁹Zr-*p*-异硫氰酸酯苯基-去铁敏-CD3 PET探针来检测小鼠克隆肿瘤模型中T淋巴细胞的募集,作为免疫治疗响应的标志^[12]。此外,研究者利用氧化铁/放射性镓标记疫苗用于SPECT(⁶⁷Ga)或PET(⁶⁸Ga)成像,用以评估体内外蛋白抗原卵清蛋白(ovalbumin, OVA)和Toll样受体9(Toll-like receptor 9, TLR9)激活剂CpG在体内的有效分布^[13]。

3.2 免疫CT

与PET相比,CT具有更高的空间分布,在肿

瘤免疫成像方面具有更广泛的应用前景。为有效实现免疫成像, 科学家们需对免疫细胞进行标记或者开发免疫造影剂。Jiao等^[14]将金纳米颗粒与靶向肿瘤的抗GD2抗体结合, 制备了一种有潜力的诊疗试剂, 它可以增强CT对比度, 并刺激自然杀伤细胞(NK)对神经母细胞瘤及黑色素瘤的攻击。Meir等^[15]利用胶体金标记表达黑色素瘤特异性T细胞受体的T细胞, 并利用CT追踪T细胞在体内的分布、迁移及动力学, 发现胶体金标记并不影响细胞的活性和繁殖, 而且CT成像能与荧光标记T细胞的荧光成像高度吻合, 表明胶体金标记的CT成像能很好地在体内追踪免疫细胞。该研究小组进一步通过在金纳米颗粒表面标记PD-L1抗体, 构建了免疫诊疗一体化纳米颗粒(a-PDL1-GNP)。此纳米颗粒不仅能够以较低剂量治疗肿瘤, 还能在48 h内通过CT成像显示a-PDL1-GNP在不同肿瘤内的蓄积情况, 发现纳米颗粒蓄积的多少与肿瘤生长抑制明显相关, 表明免疫检测点靶向CT成像能够用来预测肿瘤对免疫治疗的响应性。

3.3 免疫MRI

MRI无放射损伤且具有高软组织分辨率, 结合造影剂可以进一步提高其诊断疾病的灵敏度。因此, MRI是体内追踪免疫细胞和评估免疫治疗效果的一种理想成像方法^[16]。超顺磁氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticle, SPION)被用于标记多种免疫细胞, 用来追踪免疫细胞和评价免疫治疗效果等^[17-18]。例如, Li等^[19]利用聚赖氨酸修饰的SPION标记从预先免疫的GL261恶性胶质瘤小鼠脾脏中提取的CD8⁺ T淋巴细胞, 注射到体内24 h后, 在3.0 T MRI T2WI序列上能够清晰看到小鼠脑内肿瘤附近的黑色小点, 表明T细胞能够被SPION有效标记, 并能在体内被成功追踪。Wu等^[20]通过聚天冬氨酸-b-聚己内酯修饰SPION获得了一种120 nm左右的纳米团簇, 这种纳米团簇的横向弛豫率高达335.6 Fe·L/(mmol·s), 并具有良好的生物相容性, 能够追踪树突状细胞(DC)在淋巴系统的迁移。¹⁹F标记MRI造影剂也被开发用来在体内追踪树状细胞等免疫细

胞, 其中一种含全氟碳聚合物的水溶性纳米乳液(CS-1000)已经进入临床试验阶段^[21-22]。钆螯合物作为一种T1造影剂也被用来标记示踪免疫细胞, 但是其灵敏度低于SPION, 需要约103个细胞才能被检测。发展纳米形态的钆造影剂, 提高每个颗粒中钆的含量和弛豫率可以提高其灵敏度^[23]。MRI除追踪免疫细胞外, 还可用来评价免疫治疗效果。免疫治疗与传统疗法相比, 其肿瘤体积生长抑制反应比较慢, 通常需要两个多月才能观察到明显的肿瘤体积缩小, 因此传统的实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)不适用于免疫治疗^[24]。如何快速评价肿瘤患者对免疫治疗的响应是目前面临的一大挑战。钆造影剂如1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸钆盐(Gd-DOTA)可用作增强MRI造影剂, 实时监控肿瘤免疫治疗后的血管变化, 为评价免疫治疗效果提供参考^[25]。

3.4 光学成像探针

光学成像的灵敏度高, 在监测免疫细胞动力学方面有一定优势, 但受光穿透组织深度的限制难以实现临床应用。尽管如此, 其在揭示肿瘤细胞与免疫细胞相互作用、评估疗效等方面具有很大的潜力。例如, Qi等^[26]利用多种颜色的荧光素标记肿瘤微环境, 实时研究联合ACT和环磷酰胺治疗黑色素瘤时肿瘤细胞微环境的改变, 为优化免疫治疗与化疗联合方案提供了依据。Liu等^[27]利用近红外荧光量子点标记与疫苗融合后的同种异体树突状细胞进行体内实时成像, 观察到了肿瘤融合疫苗对胃癌的治疗效果。Rahimian等^[28]将近红外荧光量子点连接到包裹OVA的聚合物纳米颗粒上以追踪抗原在体内的转运, 证明纳米颗粒能够将抗原更有效地交叉呈递给淋巴结内OVA特异性CD8⁺ T淋巴细胞。最近, Ma等^[29]在应用单克隆抗体对HTC-116人结肠癌细胞移植瘤模型进行免疫治疗后, 用兰尼单抗[抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体的Fab片段]与荧光染料的键合物Dye755-Ran来检测VEGF表达, 实时评价肿瘤对免疫治疗的响应^[29]。

3.5 多模式成像探针

如前所述,各种成像模式在原理和反映的信息方面各有不同,而多模式成像在应用上具有互补性,可以获得反映免疫治疗效果和不良反应的大量数据。例如,Vahle等^[30]最近用氟代脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG)-PET/CT和FDG-PET/MRI等方法在小鼠模型中评价抗CD137免疫治疗单克隆抗体的抗癌效果,发现多模式成像能够精准评价肿瘤对免疫治疗的响应。Wachsmann等^[31]通过¹⁸F-FDG PET/CT研究药物伊匹单抗(Ipilimumab)对转移性黑色素瘤的治疗效果,发现了与免疫不良反应包括胰腺炎、下垂体炎、甲状腺炎及结肠炎等相关的FDG异常吸收。另外,¹⁸F-FDG PET/CT结合MRI扩散加权成像也可以有效地预测利妥昔单抗免疫治疗黏膜层淋巴组织中淋巴结外淋巴瘤的治疗效果^[32]。Kim等^[33]最近在近红外荧光分子Aza-BODIPY上键合两个钆螯合物,构建了一种MRI和荧光双功能探针,利用该探针联合MRI和近红外荧光成像可以实时追踪小鼠树突状细胞的体内行为。将多种成像功能单元与纳米材料结合是构建多功能成像单元的一种最常用方法,甚至还可以将成像单元与治疗功能结合制备诊疗一体化的多功能探针。例如,Jin等^[34]制备了载有抗原肽、SPION及吡啶菁绿的荧光磁性纳米颗粒,利用磁推力的作用增加纳米颗粒在肿瘤中的富集,增强免疫治疗效果,并通过体内外光学成像与MRI相结合来实时检测树突状细胞疫苗在淋巴系统内的迁移。

4 结论与展望

免疫治疗需要实时追踪免疫细胞和评价肿瘤对免疫治疗的响应性,传统的影像学技术难以满足需求。近年来,免疫PET、CT、MRI和光学成像等取得了大量研究进展,在免疫细胞追踪和免疫治疗评价等方面展示了广阔的应用前景。特别是优势互补的多模式成像在综合评价免疫治疗方面能够发挥巨大作用。但是,这些免疫成像技术大多基于新型影像探针,还需进一步验证它们的安全性和有效性,才能进入临床应用。目前,临床上根据RECIST来评估肿瘤对治疗的响应性。然而,免疫治疗与细胞毒性化疗完全不同,在治

疗初期会出现临床症状稳定甚至短暂的肿瘤增大或出现新病变,随后才发生肿瘤缩小或持续稳定。免疫治疗完全不同的响应方式导致RECIST标准不适用于肿瘤免疫治疗。因此,新的针对免疫治疗的影像学评价标准亟待建立。

[参考文献]

- [1] 杨何,张升,辛艳飞. 肿瘤免疫治疗研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(9): 1074-1080.
- [2] 郭振红,曹雪涛. 肿瘤免疫细胞治疗的现状及展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(2): 149-160.
- [3] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy [J]. Science, 2015, 348(6230): 56-61.
- [4] 卢珊,李苏宁,范红. 肿瘤免疫治疗技术与产品开发的现状与发展建议[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1): 104-110.
- [5] WEISSELEDER R, PITTET M J. Imaging in the era of molecular oncology [J]. Nature, 2008, 452(7187): 580-589.
- [6] KEU K V, WITNEY T H, YAGHOUBI S, et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(373): 2196-2206.
- [7] MAYER A T, NATARAJAN A, GORDON S R, et al. Practical immuno-PET radiotracer design considerations for human immune checkpoint imaging [J]. J Nucl Med, 2017, 58(4): 538-546.
- [8] MAUTE R L, GORDON S R, MAYER A T, et al. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(47): 6506-6514.
- [9] TAVARÉ R, ESCUIN-ORDINAS H, MOK S, et al. An effective immuno-PET imaging method to monitor CD8-dependent responses to immunotherapy [J]. Cancer Res, 2016, 76(1): 73-82.
- [10] FREISE A C, ZETTLITZ K A, SALAZAR F B, et al. Immuno-PET imaging of murine CD4⁺ T cells using anti-CD4 cys-diabody: effects of protein dose on T cell function and imaging [J]. Mol Imaging Biol, 2017, 19(4): 599-609.
- [11] LI A, WU Y, LINNOILA J, et al. Surface biotinylation of cytotoxic T lymphocytes for *in vivo* tracking of tumor immunotherapy in murine models [J]. Cancer Immunol Immunother, 2016, 65(12): 1545-1554.
- [12] LARIMER B M, WEHRENBURG-KLEE E, CARABALLO A, et al. Quantitative CD3 PET imaging predicts tumor growth response to anti-CTLA-4 therapy [J]. J Nucl Med, 2016, 57(10): 1607-1611.
- [13] RUIZ-DE-ANGULO A, ZABALETA A, GÓMEZ-VALLEJO V, et al. Microdosed lipid-coated ⁶⁷Ga-magnetite enhances antigen-specific immunity by image tracked delivery of antigen and CpG to lymph nodes [J]. ACS Nano, 2016, 10(1): 1602-1618.
- [14] JIAO P, OTTO M, GENG Q, et al. Enhancing both CT imaging

- and natural killer cell-mediated cancer cell killing by a GD2-targeting nanoconstruct [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(3): 513-520.
- [15] MEIR R, SHAMALOV K, BETZER O, et al. Nanomedicine for cancer immunotherapy: tracking cancer-specific T-cells *in vivo* with gold nanoparticles and CT imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(6): 6363-6372.
- [16] MAHMOUDI M, HOSSEINKHANI H, HOSSEINKHANI M, et al. Magnetic resonance imaging tracking of stem cells *in vivo* using iron oxide nanoparticles as a tool for the advancement of clinical regenerative medicine [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(2): 253-280.
- [17] SERKOVA N J. Nanoparticle-based magnetic resonance imaging on tumor-associated macrophages and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 590.
- [18] OTTOBRINI L, MARTELLI C, TRABATTONI D L, et al. *In vivo* imaging of immune cell trafficking in cancer [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38 (5): 949-968.
- [19] LI A, WU Y, TANG F, et al. *In vivo* magnetic resonance imaging of CD8⁺T lymphocytes recruiting to glioblastoma in mice [J]. *Cancer Biother Radio*, 2016, 31(9): 317-323.
- [20] WU C Q, XU Y, YANG L, et al. Negatively charged magnetite nanoparticle clusters as efficient MRI probes for dendritic cell labeling and *in vivo* tracking [J]. *Adv Funct Mater*, 2015, 25 (23): 3581-3591.
- [21] BONETTO F, SRINIVAS M, HEERSCHAP A, et al. A novel ¹⁹F agent for detection and quantification of human dendritic cells using magnetic resonance imaging [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(2): 365-373.
- [22] HELFER B M, BALDUCCI A, NELSON A D, et al. Functional assessment of human dendritic cells labeled for *in vivo* F-19 magnetic resonance imaging cell tracking [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(2): 238-250.
- [23] AHRENS E T, BULTE J W. Tracking immune cells *in vivo* using magnetic resonance imaging [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 755-763.
- [24] FENERTY K E, FOLIO L R, PATRONAS N J, et al. Predicting clinical outcomes in chordoma patients receiving immunotherapy: a comparison between volumetric segmentation and RECIST [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 672.
- [25] SANTIN M D, VANDENBERGHE M E, HERARD A S, et al. *In vivo* detection of amyloid plaques by gadolinium-stained MRI can be used to demonstrate the efficacy of an anti-amyloid immunotherapy [J]. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8: 1-10.
- [26] QI S, LI H, LU L, et al. Long-term intravital imaging of the multicolor-coded tumor microenvironment during combination immunotherapy [J]. *Elife*, 2016, 5: 14756-14784.
- [27] LI C, LIANG S, ZHANG C, et al. Allogenic dendritic cell and tumor cell fused vaccine for targeted imaging and enhanced immunotherapeutic efficacy of gastric cancer [J]. *Biomaterials*, 2015, 54: 177-187.
- [28] RAHIMIAN S, KLEINOVINK J W, FRANSEN M F, et al. Near-infrared labeled, ovalbumin loaded polymeric nanoparticles based on a hydrophilic polyester as model vaccine: *in vivo* tracking and evaluation of antigen-specific CD8⁺ T cell immune response [J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 469-477.
- [29] MA T, LIU H, SUN X, et al. Serial *in vivo* imaging using a fluorescence probe allows identification of tumor early response to cetuximab immunotherapy [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (1): 10-17.
- [30] VAHLE A K, HERMANN S, SCHÄFFERS M, et al. Multimodal imaging analysis of an orthotopic head and neck cancer mouse model and application of anti-CD137 tumor immune therapy [J]. *Head Neck*, 2016, 38 (4): 542-549.
- [31] WACHSMANN J W, GANTI R, PENG F. Immune-mediated disease in ipilimumab immunotherapy of melanoma with FDG PET-CT [J]. *Acad Radiol*, 2017, 24 (1): 111-115.
- [32] MAYERHOEFER M E, KARANIKAS G, KLETTER K, et al. Can interim ¹⁸F-FDG PET or diffusion-weighted MRI predict end-of-treatment outcome in FDG-avid MALT lymphoma after rituximab-based therapy? A preliminary study in 15 patients [J]. *Clin Nucl Med*, 2016, 41(11), 837-843.
- [33] KIM E J, BHUNIYA S, LEE H, et al. *In vivo* tracking of phagocytic immune cells using a dual imaging probe with gadolinium-enhanced MRI and near-infrared fluorescence [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(16): 10266-10273.
- [34] JIN H, QIAN Y, DAI Y, et al. Magnetic enrichment of dendritic cell vaccine in lymph node with fluorescent-magnetic nanoparticles enhanced cancer immunotherapy [J]. *Theranostics*, 2016, 6 (11): 2000-2014.

(收稿日期: 2018-05-17 修回日期: 2018-06-29)