·论 著·

NSP在PD-1抑制剂相关脊髓损伤治疗中的应用

宋骏，陈华春，倪小伟

【摘要】目的 探究神经丝氨酸蛋白酶抑制剂（NSP）在靶向程序性死亡蛋白1（PD-1）抑制剂相关脊髓损伤（SCI）治疗中的应用效果。方法 采用Rag1$^{-/-}$小鼠作为受体进行骨髓移植，检测移植后Rag1$^{-/-}$小鼠外周血和骨髓CD8^{+}T细胞占比。将骨髓移植的Rag1$^{-/-}$小鼠分为4组（各6只）：对照组，腹腔内注射免疫球蛋白G（IgG）（200 μg）；SCI模型组，腹腔内注射抗程序性死亡受体1（PD-1）（200 μg）；SCI模型+CD8^{+} T细胞移植组，尾静脉注射初始型CD8^{+} T细胞（5×10^{6}），腹腔内注射抗PD-1（200 μg）；NSP治疗组，鞘内注射25 μl NSP，腹腔内注射抗PD-1（200 μg）。4组小鼠进行BMS测试。采用酶联免疫吸附法和qRT-PCR检测小鼠血清及全骨髓细胞中SCI标志物茴香胺10（Ano10）、骨髓基质细胞抗原1（Bst1）、白介素1受体I（Il1r1）和Zfp36环指蛋白样2（Zfp36l2）水平。结果 SCI模型组BMS评分低于对照组（$P < 0.05$）；全骨髓细胞Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA水平高于对照组，而Zfp36l2 mRNA水平低于对照组（均$P < 0.05$）；酶联免疫吸附实验结果与之一致。SCI模型+CD8^{+}T细胞移植组BMS评分低于SCI模型组（$P < 0.05$）；全骨髓细胞Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA水平高于SCI模型组，而Zfp36l2 mRNA水平低于SCI模型组（均$P < 0.05$）；酶联免疫吸附实验结果与之一致。NSP治疗组BMS评分高于SCI模型组（$P < 0.05$）；全骨髓细胞Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA水平低于SCI模型组，而Zfp36l2 mRNA水平高于SCI模型组（均$P < 0.05$）；酶联免疫吸附实验结果与之一致。结论 CD8^{+} T细胞在PD-1抑制剂相关SCI发生中发挥重要作用，联合使用NSP可以缓解抗PD-1治疗导致的SCI。

【关键词】 神经丝氨酸蛋白酶抑制剂；抗PD-1治疗；免疫相关不良反应；脊髓损伤；CD8^{+} T细胞
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.07.004
【中图分类号】 R744 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2025)07-0675-04

The application of NSP in the treatment of PD-1 inhibitor-related spinal cord injury

SONG Jun, CHEN Huachun, NI Xiaowei (Zhejiang Jinhua Guangfu Tumor Hospital, 321000 Jinhua, Zhejiang, China)

【Abstract】**Objective** To investigate the application effect of neuroserine protease inhibitor (NSP) in the treatment of programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitor related spinal cord injury (SCI). **Methods** Rag1$^{-/-}$mice were used as recipients for bone marrow transplantation, and the proportion of CD8^{+} T cells in the peripheral blood and bone marrow of Rag1$^{-/-}$ mice were detected after transplantation. The bone marrow transplanted Rag1$^{-/-}$ mice were randomly divided into four groups (six mice per group): the control group, intraperitoneally injected with immunoglobulin G (IgG) (200 μg); the SCI model group, intraperitoneally injected with pembrolizumab (200 μg); the SCI model+CD8^{+} T cell transfer group, tail vein injection of initial-type CD8^{+} T cells (5×10^{6}) on the basis of the SCI group; the NSP treatment group, intrathecal injection NSP (25 μl) on the basis of the SCI group. The motor function of the four groups was evaluated by BMS test. The levels of SCI markers anisamine 10 (Ano10), bone marrow stromal cell antigen 1 (BST1), interleukin-1 receptor I (Il1r1) and Zfp36 ring finger protein-like 2 (Zfp36l2) in serum and bone marrow cells were detected by ELISA and qRT-PCR. **Results** The BMS score of the SCI model group was lower than that of control group ($P < 0.05$). The mRNA levels of Ano10, Bst1 and Il1r1 of SCI model group were significantly higher than those of the control group (all $P < 0.05$), while the mRNA level of Zfp36l2 was lower than that of control group ($P < 0.05$), the results of ELISA were consistent. The BMS score of the SCI model+CD8^{+} T cell transplantation group was lower than that of SCI model group ($P < 0.05$). The mRNA levels of Ano10, Bst1 and Il1r1 of

基金项目： 浙江省基础公益研究计划（LGD21C040001）
作者单位： 321000 浙江省金华，浙江金华广福肿瘤医院
通信作者： 宋骏，Email：sjun18857959610@163.com

SCI model+CD8$^+$ T cell transplantation group were significantly higher than those of SCI model group (all $P < 0.05$), while the mRNA level of Zfp36l2 was lower than that of SCI model group, the results of ELISA were consistent. The BMS score of the NSP treatment group was higher than that of SCI model group ($P < 0.05$). The mRNA level of Ano10, Bst1 and Il1r1 of NSP treatment group were significantly lower than those of SCI model group (all $P < 0.05$), while the mRNA levels of Zfp36l2 was higher than that of SCI model group ($P < 0.05$), the results of ELISA were consistent. **Conclusions** CD8$^+$ T cells play an important role in the occurrence of PD-1 inhibitor related SCI, and the combination of NSP can alleviate SCI caused by anti-PD-1 therapy.

【Key words】 Neuroserpin; Anti-PD-1 therapy; Immune related adverse events ; Spinal cord injury; CD8$^+$ T cells

[Modern Practical Medicine,2025,37(7):675-678]

靶向程序性死亡蛋白 1（programmed cell death protein 1，PD-1）抑制剂在肿瘤治疗中疗效良好，纳武单抗和帕博利珠单抗等 PD-1 抑制剂通过诱导晚期和转移性肺癌的退化显著提高了患者生存率[1]。然而，部分肿瘤患者接受免疫检查点阻断治疗后出现严重的免疫相关不良反应（immune related adverse events，irAEs），其中，神经系统毒性损伤占比高达 15%，包括脊髓损伤（spinal cord injury，SCI）[2]。Rag1$^{-/-}$小鼠作为一种免疫缺陷模型，广泛应用于骨髓移植和 SCI 等领域。本研究通过构建骨髓嵌合体 Rag1$^{-/-}$小鼠模型，分析 PD-1 阻断导致 SCI 的机制，并探讨神经丝氨酸蛋白酶抑制剂（neuroserpin，NSP）在由抗 PD-1 治疗引起 SCI 中的作用，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 8 周龄 Rag1$^{-/-}$小鼠（C57BL/6 背景）和 C57BL/6 小鼠，体质量 21 ～ 24 g，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [许可证号：SCXK（苏）2018-0008]。小鼠饲养于（50±10）%的湿度、（22±2）℃的温度和 12 h 光/暗周期环境中，并给予足够的水和食物。动物实验操作严格遵循国际动物福利和伦理指导原则，并获得金华市食品药品检验检测研究院实验动物伦理委员会批准（AL-JSYJ202023）。

1.1.2 药品与试剂 PD-1 抑制剂帕博利珠单抗及 IgG 购自 MedChemexpress 生物科技公司；抗小鼠-CD3 FITC、CD3 PerCP、CD4 PE、CD8 PB450、CD8 FITC、IFN-γFITC、IL-4APC、IL-17 购自 Biolegend 公司；抗 FoxP3 单克隆抗体（小鼠源）购自 Wako 公司；抗β-actin 单克隆抗体（小鼠源）购自 Sigma 公司；磷酸盐缓冲生理盐水购自 Sigma-Aldrich 公司；NSP 购自 Abcam 公司；anti-Rag1 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；茴香胺 10（anoctamin 10，Ano10）、骨髓基质细胞抗原 1（cyclic ADP-ribose hydrolase 2，Bst1）、白介素 1 受体 I（Interleukin 1 receptor type 1，Il1r1）和 Zfp36 环指蛋白样 2（Zfp36 Ring Finger Protein Like 2 Antibody，Zfp36l2）酶联免疫吸附试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司；cDNA 逆转录试剂盒购自赛默飞世尔科技有限公司；戊巴比妥钠、Trizol 试剂、SYBR Green 试剂盒、蛋白酶 K 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 仪器 PCR 仪、流式细胞仪购自赛默飞世尔科技有限公司，流式细胞分选仪购自 BD Biosciences 公司；X-RAD 320 X 射线辐照仪购自美国 Precision X-ray Inc 公司。

1.2 方法

1.2.1 骨髓嵌合体 Rag1$^{-/-}$小鼠构建 采用野生型小鼠作为供体，Rag1$^{-/-}$小鼠则作为受体。从野生型小鼠中分离骨髓细胞，通过尾静脉注射到经辐照（5.5 Gy）的 Rag1$^{-/-}$小鼠体内。移植后 1 个月，按照流式细胞术的标准操作程序检测 CD8$^+$ T 细胞的占比。

1.2.2 分组 骨髓移植的 Rag1$^{-/-}$小鼠被随机分为 4 组（每组 6 只）：对照组，腹腔内注射 IgG（200 μg）；SCI 模型组，腹腔内注射抗 PD-1（帕博利珠单抗 200μg）；SCI 模型+CD8$^+$ T 细胞移植组，通过尾静脉注射从野生型小鼠脾脏中分离出的初始型 CD8$^+$ T 细胞（5×10^6），然后腹腔内注射抗 PD-1（200 μg）；NSP 治疗组，通过鞘内注射 20 μg/ml NSP（25 μl），然后腹腔内注射抗 PD-1（200 μg）。IgG 或抗 PD-1 每周注射 1 次，连续 4 周。

1.2.3 运动功能评估 建模第 28 天采用 BMS 评分对小鼠的运动功能进行评估。评分前先将小鼠放置在开放区域中自由活动 10 min，后对每只小鼠进行为期 4 min 的观察[3]。评分过程由两名接受过 BMS

评分培训且对小鼠具体分组不知情的独立评估员完成。BMS 评分分值越高，代表小鼠后肢运动功能越好。

1.2.4　SCI 标志物检测　在建模后 7 周，通过腹腔注射戊巴比妥钠实施安乐死，取小鼠血清及全骨髓细胞。采用酶联免疫吸附试剂盒检测小鼠血清 Ano10、Bst1、Il1r1 和 Zfp36l2 水平。使用 qRT-PCR 检测小鼠全骨髓细胞中 Ano10、Bst1、Il1r1 和 Zfp36l2 的 mRNA 表达水平。使用 Trizol 试剂提取小鼠全骨髓细胞总 RNA，反转录为 cDNA。以 GAPDH 作为内参基因，使用 SYBR Green qRT-PCR 试剂盒进行定量 PCR 检测。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。实验使用的引物序列见表 1。

1.3　统计方法　利用 Prism 9.2.1 统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差表示，多组比较采用方差分析，两组比较采用独立样本 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　骨髓嵌合体 $Rag1^{-/-}$ 小鼠构建　骨髓移植 $Rag1^{-/-}$ 小鼠骨髓细胞中 $CD3^+CD8^+$ T 细胞的比例高于正常 $Rag1^{-/-}$ 小鼠（$P < 0.05$），表明骨髓移植 $Rag1^{-/-}$ 小鼠模型建立成功，见图 1。

2.2　BMS 评分　4 组 BMS 评分差异有统计学意义（$P < 0.05$），SCI 模型组 BMS 评分低于对照组（$P < 0.05$），SCI 模型+$CD8^+$T 细胞移植组 BMS 评分低于 SCI 模型组（$P < 0.05$），NSP 治疗组 BMS 评分高于 SCI 模型组（$P < 0.05$），见图 2A。SCI 模型组造模后 1、2、3、4 周，小鼠骨髓中 $CD3^+$ $CD8^+$ T 细胞的比例逐渐增加（$P < 0.05$），见图 2B。

表 1　qRT-PCR 引物序列表

引物名称	正向引物序列（5’→3’）	反向引物序列（5’→3’）
Ano10	ATGTCAAAGATGAAACCAA	TGTTTGATAATGAACTGACA
Bst1	TGGACAGGGGAGGGTACC	GAAATCGCCAACTTTGCCA
Il1r1	AGTGTTTATTTGCTCAGCA	CTTGCTGTCATTCTTGTA
Zfp36l2	TGCAAGACGGAGAAATCCC	GCGGTCTGGCCTCCTACG

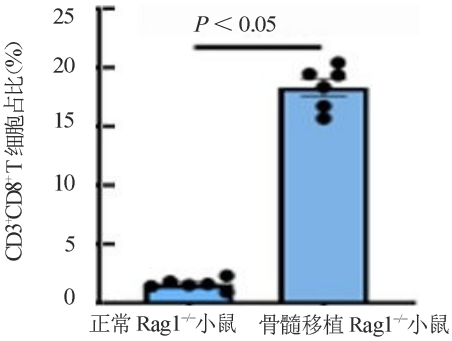
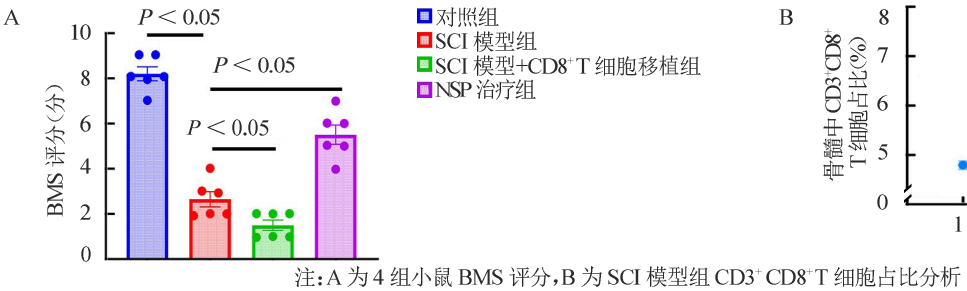


图 1　骨髓移植 $Rag1^{-/-}$ 小鼠骨髓细胞中 $CD3^+$ $CD8^+$ T 细胞占比



注：A 为 4 组小鼠 BMS 评分，B 为 SCI 模型组 $CD3^+$ $CD8^+$ T 细胞占比分析

图 2　4 组小鼠 BMS 评分及 SCI 模型组 $CD3^+$ $CD8^+$ T 细胞占比

2.3　脊髓损伤标志物 mRNA 水平　4 组小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1、Zfp36l2 mRNA 水平差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$）。SCI 模型组小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平高于对照组，而 Zfp36l2 mRNA 水平低于对照组（均 $P < 0.05$）；SCI 模型+$CD8^+$T 细胞移植组小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平高于 SCI 模型组，Zfp36l2 mRNA 水平低于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$）；NSP 治疗组小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平低于 SCI 模型组，Zfp36l2 mRNA 水平高于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$），见封三图 2。

2.4　脊髓血清损伤标志物水平　4 组血清 Ano10、Bst1、Il1r1、Zfp36l2 水平差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$）。SCI 模型组小鼠血清 Ano10、Bst1、Il1r1 水平高于对照组，而 Zfp36l2 水平低于对照组（均 $P < 0.05$）；SCI 模型+$CD8^+$T 细胞移植组小鼠血清 Ano10、Bst1、Il1r1 水平高于 SCI 模型组，Zfp36l2 水平低于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$）；NSP 治疗组小鼠血清 Ano10、Bst1、Il1r1 水平低于 SCI 模型组，Zfp36l2 水平高于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$），见封三图 3。

3　讨论

阻断 PD-1 与 PD-L1 相互作用可加速 $CD8^+$T 细胞的增长，并诱导对癌细胞的细胞毒性[4]。PD-1 的单克隆抗体在癌症治疗中临床效果显著[5-6]。部分接

受免疫检查点阻断治疗的癌症患者遭受严重的不良效应[7]。irAEs 的发生与炎症反应相关，特别是 $CD8^+$ T 细胞激活介导的炎症反应[8-9]。重组活化基因在 B、T 细胞受体的重组过程中起着重要作用，敲除小鼠无法产生成熟的 B 和 T 细胞，常被用作免疫学研究中的受体[10-12]。BMS 评分常被用于 SCI 程度的评估[13]。本研究结果显示，SCI 模型组 BMS 评分低于对照组（$P < 0.05$），表明 PD-1 抑制剂注射可诱导骨髓嵌合体 $Rag1^{-/-}$小鼠后肢功能障碍。Ano10 基因在固有免疫过程中发挥核心作用。Bst1 是一种免疫调节分子，主要负责免疫细胞的发育。Zfp36l2 通过调节 T 细胞功能参与中枢神经系统炎症反应[14]。Il1r1 是一种细胞膜受体蛋白，在 SCI 后表达逐渐增高[15]。本研究结果显示，SCI 模型组小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平高于对照组，Zfp36l2 mRNA 水平低于对照组（均 $P < 0.05$），小鼠血清酶联免疫吸附检测结果与之一致。这表明采用帕博利珠单抗腹腔注射处理的骨髓嵌合体 $Rag1^{-/-}$小鼠显示出了 SCI，其可作为研究抗 PD-1 治疗相关 SCI 的模型。

以往研究表明，脊髓遭受损伤后大鼠外周血液 $CD8^+$ T 细胞数量上升，损伤区域出现 $CD8^+$ T 细胞聚集[16-17]。本研究结果显示，SCI 模型+$CD8^+$T 细胞移植组 BMS 评分低于 SCI 模型组全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平高于 SCI 模型组，Zfp36l2 mRNA 水平低于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$）。NSP 治疗组 BMS 评分高于 SCI 模型组，小鼠全骨髓细胞 Ano10、Bst1、Il1r1 mRNA 水平低于 SCI 模型组，而 Zfp36l2 mRNA 水平高于 SCI 模型组（均 $P < 0.05$），血清酶联吸附反应检测结果与之一致。这表明 NSP 可显著降低抗 PD-1 治疗诱导的 SCI，与既往关于 NSP 脊柱神经保护作用的研究结论一致[18]。

综上所述，$CD8^+$ T 细胞可加重 SCI 的严重程度，NSP 可显著降低抗 PD-1 治疗诱导的 SCI。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 宋骏、陈华春：研究指导、实验操作、论文撰写、论文修改、经费支持；宋骏、倪小伟：数据整理、统计学分析

参 考 文 献

[1] DANTOING E, PITON N, SALAUN M, et al. Anti-PD1/PD-L1 immunotherapy for non-small cell lung cancer with actionable oncogenic driver mutations[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6288.

[2] RAMOS-CASALS M, BRAHMER J R, CALLAHAN M K, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 38.

[3] 董文旭,郭守玉,胡波.程序性细胞死亡配体-1 通过调节 T 细胞免疫在脊髓损伤小鼠模型中发挥神经保护作用[J].西安交通大学学报(医学版),2024,45(6):927-933.

[4] TICHET M, WULLSCHLEGER S, CHRYPLEWICZ A, et al. Bispecific PD1-IL2v and anti-PD-L1 break tumor immunity resistance by enhancing stem-like tumor-reactive $CD8^+$ T cells and reprogramming macrophages[J]. Immunity, 2023, 56(1): 162-179.

[5] CASCONE T, AWAD M M, SPICER J D, et al. Perioperative nivolumab in resectable lung cancer[J]. N Engl J Med, 2024, 390 (19): 1756-1769.

[6] WAKELEE H, LIBERMAN M, KATO T, et al. Perioperative pembrolizumab for early-stage non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2023, 389(6): 491-503.

[7] WRIGHT J J, POWERS A C, JOHNSON D B. Endocrine toxicities of immune checkpoint inhibitors[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17 (7): 389-399.

[8] POTO R, TROIANI T, CRISCUOLO G, et al. Holistic approach to immune checkpoint inhibitor-related adverse events[J]. Front Immunol, 2022, 13: 804597.

[9] 唐润妍,惠首智,张明,等.PD1 基因敲除加重小鼠脊髓损伤后继发性损伤的研究[J].神经解剖学杂志,2021,37(5):517-524.

[10] GAN T T, WANG Y H, LIU Y, et al. RAG2 abolishes RAG1 aggregation to facilitate V(D)J recombination[J]. Cell Rep, 2021, 37(2): 109824.

[11] HE D, ZHANG J H, WU W W, et al. A novel immunodeficient rat model supports human lung cancer xenografts[J]. FASEB J, 2019, 33(1): 140-150.

[12] 沈如凌,石嘉豪,盛哲津,等.Rag1、Rag2 基因缺陷小鼠的构建及在异种肿瘤移植中的应用[J].实验动物与比较医学,2016,36(4): 263-269,279.

[13] 米晓丹.噻呤能P2Y12 受体在脊髓损伤中的作用及机制研究[D].杭州:浙江省医学科学院,2024.

[14] LI X L, YANG Y, XU S M, et al. Screening biomarkers for spinal cord injury using weighted gene co-expression network analysis and machine learning[J]. Neural Regen Res, 2024, 19(12): 2723-2734.

[15] 王晨峰.脊髓损伤疾病标记物 IL1R1，CASP4 和 IGSF6 识别及其免疫治疗的研究[D].上海:中国人民解放军海军军医大学,2022.

[16] 时愔,杨华,王开化,等.慢性脊髓损伤通过上调 PD-1 表达破坏 $CD8^+$T 细胞的功能[J].中国老年学杂志,2018,38(2):298-300.

[17] 江政松.脊髓损伤 SD 大鼠外周血和损伤局部 CD8+T 淋巴细胞亚群的变化[D].蚌埠:蚌埠医学院,2014.

[18] LI Z, LIU F, ZHANG L, et al. Neuroserpin restores autophagy and promotes functional recovery after acute spinal cord injury in rats[J]. Mol Med Rep,2018 ,17(2):2957-2963.

收稿日期：2025-03-17

（本文编辑：孙海儿）