

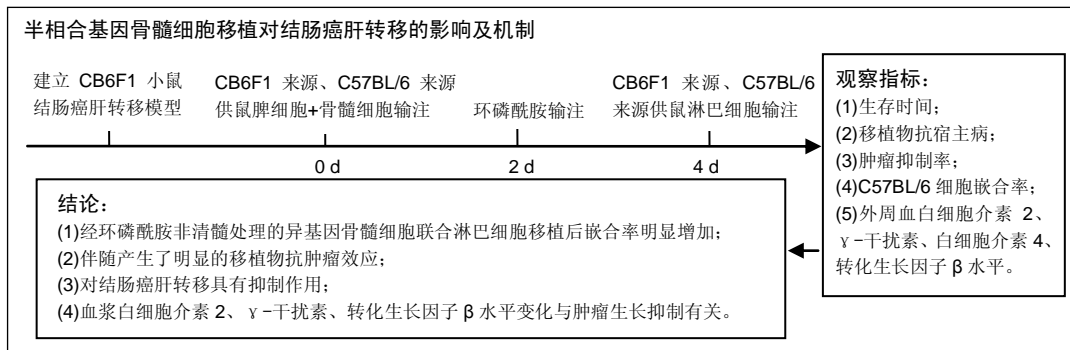
异基因骨髓细胞联合淋巴细胞输注抑制结肠癌肝转移

瞿元乾, 周庆, 张进, 徐三荣(江苏大学附属医院普外科, 江苏省镇江市 212000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0963

ORCID: 0000-0002-2107-9016(瞿元乾)

文章快速阅读:



瞿元乾, 男, 1987 年生, 江苏省金坛市人, 汉族, 江苏大学在读硕士, 医师, 主要从事普通外科方面的研究。

通讯作者: 徐三荣, 博士, 主任医师, 江苏大学附属医院普外科, 江苏省镇江市 212000

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

稿件接受: 2018-04-16



文题释义:

移植物抗宿主病: 是小鼠移植异基因淋巴细胞后, 经受者发动的一系列“细胞因子风暴”刺激, 显著增强了其对受者抗原的免疫反应, 以受者靶细胞为目标发动细胞毒攻击, 其中皮肤、肝及肠道是主要的靶目标。小鼠多表现为体质量减轻、活动能力下降以及皮毛光泽变差、皮肤出现溃烂并有弓背等表现。不同表现可以评估小鼠的移植物抗宿主病严重程度。

非骨髓造血干细胞移植: 又称降低预处理强度的造血干细胞移植, 简称为小移植。其关键点是选用达到足够强度的免疫抑制, 但受者的骨髓仅仅被抑制而未摧毁的预处理方案, 使供者的造血干细胞能安全植入(因受者的免疫功能已被足够抑制, 不会产生排异反应), 又使受者残存的造血功能在短时间内恢复, 形成在一定时间内供、受者造血细胞同时存在, 称为嵌合状态。这样可造成受者的免疫耐受, 从而减少移植物抗宿主病的发生率及降低严重程度。

摘要

背景: 异基因造血干细胞移植对结肠癌术后肝转移的预防和治疗在临床以及动物实验中鲜有研究报道, 结肠癌术后肿瘤负荷较小, 此时建立混合型嵌合体可望取得一定疗效。

目的: 探讨异基因造血干细胞移植对结肠癌肝转移的抑制作用及其对嵌合体和移植物抗宿主病的影响, 并对其抑瘤机制进行研究。

方法: BALB/cx57BL/6 杂交一代 CB6F1 小鼠保脾注射 CT-26 大肠癌细胞建立结肠癌肝转移模型, 随机分为 4 组: 对照组、环磷酸胺组、全相合脾细胞加骨髓细胞移植+环磷酸胺组(全相合移植组)、半相合脾细胞加骨髓细胞移植+环磷酸胺组(半相合移植组), 每组 8 只。取自 C57BL/6 小鼠和 CB6F1 小鼠骨髓及脾细胞混合后行尾静脉注射, 之后接受腹腔注射环磷酸胺进行非骨髓性预处理, 再输注供鼠淋巴细胞。观察各组小鼠生存时间、肿瘤肝转移以及移植物抗宿主病发生情况; 流式细胞仪进行嵌合体分析, ELISA 方法测定血浆白细胞介素 2、 γ -干扰素、白细胞介素 4、转化生长因子 β 水平。

结果与结论: ①半相合移植组小鼠生存期明显延长, 结肠癌肝转移抑制率明显提高, 抑瘤率明显增加, 与环磷酸胺组及全相合移植组相比, 差异有显著性意义; ②半相合移植组小鼠混合细胞移植 7 d 后, 供鼠细胞嵌合率逐渐增加; 至移植后 28 d, 供鼠细胞基本取代受鼠细胞, 嵌合率达 99% 以上; ③半相合移植组小鼠的移植物抗肿瘤效应明显增强, 但未出现严重的移植物抗宿主病症状, 且小鼠血浆白细胞介素 2、 γ -干扰素水平较其他组明显升高, 转化生长因子 β 水平明显降低, 而白细胞介素 4 水平无明显差异; ④结果表明, 小鼠经环磷酸胺非骨髓处理的异基因骨髓细胞联合淋巴细胞移植后嵌合率明显增加, 伴随产生了明显的移植物抗肿瘤效应, 其对结肠癌肝转移具有抑制作用。血浆白细胞介素 2、 γ -干扰素、转化生长因子 β 水平变化与肿瘤生长抑制是有关联的。

关键词:

结肠癌肝转移; 异基因; 骨髓细胞; 脾细胞; 淋巴细胞; 移植物抗宿主病; 嵌合体; 小鼠; 干细胞; 国家自然科学基金

主题词:

结肠肿瘤; 肿瘤转移; 肝; 骨髓移植; 淋巴细胞; 嵌合体; 移植物抗宿主病; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金项目(81301693); 江苏省自然科学基金项目(BK20130474); 镇江市社会发展项目(SH2015056)

Qu Yuan-qian, Master candidate, Physician, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Xu San-rong, M.D., Chief physician, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Inhibiting colorectal cancer liver metastasis by combined injection of allogeneic bone marrow cells and lymphocytes

Qu Yuan-qian, Zhou Qing, Zhang Jin, Xu San-rong (Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Clinical and experimental studies on prevention and treatment of hepatic metastasis after colonic cancer treatment by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation have yet to be well reported. A mixed chimera is expected to achieve certain effects in patients with low-tumor burden after colorectal cancer resection.

OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation on colorectal cancer liver metastasis as well as the effect on chimera level and graft-versus-host disease and to study the anti-tumor mechanism.

METHODS: CB6F1 mice were hybridized by BALB/cx C57BL/6 mice and injected with CT-26 cells to make animal models of colorectal cancer liver metastasis. Then, model mice were randomized into four groups ($n=8$ per group): control group, cyclophosphamide group, HLA-identical spleen cells plus bone marrow cell transplantation+cyclophosphamide group (HLA-identical transplantation group), and haploidentical spleen cells plus bone marrow cell transplantation+cyclophosphamide group (haploidentical transplantation group). Mixture of spleen cells and bone marrow cells from CB6F1 and C57BL/6 mice were injected *via* the tail vein followed by a non-myeloablative pretreatment with intraperitoneal injection of cyclophosphamide, and thereafter, lymphocytes were given *via* infusion. Survival time, tumor liver metastasis and the occurrence of graft-versus-host disease were observed in mice. The chimera was analyzed by flow cytometry, and levels of plasma interleukin-2, interferon- γ , interleukin-4, and transforming growth factor β were determined by ELISA

RESULTS AND CONCLUSION: The survival time and inhibition rate of liver metastasis in the haploidentical transplantation group were significantly prolonged and increased compared with cyclophosphamid and HLA-identical transplantation group, respectively. At 7 days after transplantation, the chimera level in the haploidentical transplantation group was significantly increased up to over 99% at 28 days of transplantation, indicating that donor cells were basically substituted by recipient cells. Significantly enhanced anti-tumor effect was found in the haploidentical transplantation group, while there were no signs of severe graft-versus-host disease. Moreover, the levels of plasma interleukin-2 and interferon- γ in mice were significantly higher than those in the other groups, and the level of transforming growth factor β was significantly reduced. However, there was no significant difference in the interleukin 4 level. To conclude, co-transplantation of cyclophosphamide-pretreated allogeneic bone marrow cells and lymphocytes significantly increases the chimera level, accompanied by the production of obvious anti-tumor effect of the graft that has an inhibitory effect on colorectal cancer liver metastasis. Changes in levels of plasma interleukin-2, interferon- γ , interleukin-4, and transforming growth factor β are associated with tumor growth inhibition.

Subject headings: Colonic Neoplasms; Neoplasm Metastasis; Liver; Bone Marrow Transplantation; Lymphocytes; Chimera; Graft vs Host Disease; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81301693; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK20130474; the Social Development Project of Zhenjiang City, No. SH2015056

0 引言 Introduction

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 据临床统计, 结直肠癌患者约25%发生同时性肝转移, 超过30%发生异时性肝转移, 对因结直肠癌死亡的患者进行尸检时发现60%~70%存在肝转移, 肝转移已成为影响结直肠癌患者预后的最大问题^[1-2]。结肠癌发生多发性肝转移或广泛转移时, 传统的放化疗、介入等治疗效果有限, 而异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT) 治疗实体瘤则给终末期恶性肿瘤患者带来了希望。异基因造血干细胞移植首先用于治疗恶性血液病并取得良好疗效^[3-4], 临床应用已有近30年历史, 其治疗机制是通过移植物抗白血病效应实现。此后临床研究发现异基因造血干细胞移植用于实体瘤治疗如肾癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等也取得了相似疗效, 进展期肾癌多发转移患者取得了约8.5年的生存期, 很多乳腺癌、结肠癌、前列腺癌伴广泛转移患者取得了无瘤生存或延缓病情进展^[5-8]。

实验以小鼠为临床前研究对象, 建立小鼠结肠癌肝转移模型后, 通过不同预处理方案进行分组, 旨在探讨异基因造血干细胞移植对结肠癌肝转移的抑制作用及其对嵌合体 and 移植抗宿主病的影响, 并对其抑瘤机制进行研究。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年7月至2017年12月在江苏大学免疫学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物和细胞 供鼠: SPF级 C57BL/6 (H-2Kb)16只, BALB/cx C57BL/6 杂交一代 CB6F1小鼠 (H-2Kd/b)8只; 受鼠: CB6F1小鼠 (H-2Kd/b)48只, 8-12周龄, 体质量18-22 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。CT-26大肠癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3.2 实验仪器和试剂 流式细胞仪 (美国BD公司); PE-H-2Kd和FITC-H-2Kb单抗 (美国BD公司); 环磷酸胺注射剂 (江苏恒瑞制药厂); RPMI 1640培养液 (美国GIBCO公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 受鼠结肠癌肝转移模型建立^[9] 取指数生长期CT-26细胞进行实验, 细胞浓度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。小鼠称体质量后, 腹腔注射0.5%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉, 按无菌操作原则取左上腹纵切口进入腹腔, 离断脾胃韧带, 将脾脏显露于切口外。用带0.3 mm细针头的1 mL注射器从脾脏组织较厚处进针, 缓慢注入CT-26细胞悬液0.1 mL, 至注射

部位脾被膜发白肿胀,退针后即棉球压迫止血并轻柔 ≥ 5 min,使肿瘤细胞通过脾静脉和门静脉造成血液转移,随后关腹。

1.4.2 骨髓细胞和脾细胞的制备 采用颈椎脱位法处死供鼠,在体积分数为75%的乙醇中浸泡 5 min,无菌取出小鼠的脾脏及股骨,配制成脾细胞悬液和骨髓细胞悬液,用RPMI1640培养液将脾细胞、骨髓细胞调整细胞浓度为 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$,将脾细胞及骨髓细胞等比例、等体积混合。

1.4.3 实验小鼠的分组 取CB6F1小鼠(H-2Kd/b)40只,按照完全随机分组原则分为4组,分别为对照组、环磷酰胺组、全相合脾细胞+骨髓细胞移植+环磷酰胺组(全相合移植组)、半相合脾细胞+骨髓细胞移植+环磷酰胺组(半相合移植组),每组8只。另选取8只与半相合移植组处理相同的小鼠为监测组,用于嵌合体的检测。

1.4.4 实验小鼠的处理方法 受鼠行脾细胞+骨髓细胞移植前1周开始饮用含庆大霉素的饮用水,至脾细胞+骨髓细胞移植后2周。全相合移植组和半相合移植组小鼠建立结肠癌肝转移模型后3 d分别经尾静脉输注全相合或半相合 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 脾细胞+ $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 骨髓细胞悬液0.4 mL,2 d后开始对除对照组外各组受鼠进行腹腔注射环磷酰胺,处理方案为:用生理盐水把环磷酰胺稀释成30 g/L,以200 mg/kg通过腹腔注射给受鼠进行非骨髓性预处理,对照组小鼠的处理方案为:单纯用生理盐水腹腔注射。全相合移植组和半相合移植组在注射环磷酰胺后2 d分别将来源于供鼠的 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 取之腋窝、腹股沟、肠系膜的全相合和半相合小鼠淋巴细胞通过尾静脉注射给受鼠,注射0.2 mL。

1.4.5 各组小鼠存活状态及存活时间观察 观察各组小鼠存活时间,并对死亡小鼠进行解剖通过大体观察及组织病理明确死亡原因(移植抗宿主病、肿瘤发展、感染)。

1.4.6 移植抗宿主病评分 根据受鼠的体质量变化、活动能力下降情况以及皮毛光泽、皮肤完整性、姿势有无弓背等对移植抗宿主病进行评估,见表1。

1.4.7 肿瘤肝转移状况 结肠癌肝转移模型建立后30 d,小鼠称体质量后,腹腔注射0.5%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉,按无菌操作原则取上腹正中纵切口进入腹腔,暴露肝脏,观察肿瘤肝转移情况,采集以下指标:①行肝脏表面转移瘤结节肉眼计数,根据肝转移灶数目分为4个等级,0级:肝脏无转移病灶;1级:1-5个转移病灶;2级:6-10个转移病灶;3级: >10个转移病灶;②计算肝转移抑制率,抑制率=(对照组肝转移鼠数-治疗组肝转移鼠数)/对照组肝转移鼠数;③行肝脏表面 $\geq 2 \text{ mm}$ 转移瘤结节计数,并计算抑瘤率,抑瘤率=(对照组肝表面 $\geq 2 \text{ mm}$ 转移瘤平均结节数-治疗组肝表面 $\geq 2 \text{ mm}$ 转移瘤平均结节数)/对照组肝表面 $\geq 2 \text{ mm}$ 转移瘤平均结节数。

1.4.8 流式细胞计数检测外周血嵌合率 取用于嵌合体检测的半相合移植小鼠8只,于混合细胞移植后 3, 7, 14, 28 d内毗取血100 μL ,置于肝素生理盐水润洗过的15 mL离心管中,加PBS稀释至1 mL,加入小鼠专用红细胞裂解

液1 mL及PBS 3 mL,吹打混合后静置3 min,1 200 r/min离心5 min,弃上清液,加5 mL PBS再洗一遍,加入100 μL PBS,吹打后移至流式管中,加入1 μL FITC H2Kb及1 μL PE H2Kd,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,3 mL PBS再洗一遍,加入100 μL PBS,吹匀,上机检测。

1.4.9 ELISA 检测外周血白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 蛋白水平 结肠癌肝转移模型建立后30 d时内毗取血200 μL ,通过ELISA方法测定血浆白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 蛋白水平。

1.4.10 病理检测 结肠癌肝转移小鼠模型建立后30 d时,留取荷瘤小鼠皮肤、肝脏及小肠等组织,用体积分数为10%的中性甲醛固定,制备石蜡切片,进行苏木精-伊红染色。

1.5 主要观察指标 受鼠生存时间、肿瘤肝转移情况、外周血嵌合率以及外周血白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 蛋白水平。

1.6 统计学分析 实验数据采用SPSS 19.0软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,2个以上样本均数的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。肝转移瘤数目比较采用非参数检验方法,生存分析采用按Kaplan-Meier法进行统计处理。

2 结果 Results

2.1 生存时间 对照组中位生存期31.5 d,环磷酰胺组中位生存期51.5 d,全相合移植组中位生存期52 d,半相合移植组生存期均 > 90 d。半相合移植组生存期较其他3组差异有显著性意义($P < 0.05$)。生存时间比较见图1。

2.2 移植抗宿主病的观察

2.2.1 急性移植抗宿主病评分 移植后第7,14天全相合移植组急性移植抗宿主病评分明显低于半相合移植组,且差异有显著性意义($P < 0.05$),第28天全相合移植组急性移植抗宿主病评分与半相合移植组相比差别减小,差异无显著性意义($P > 0.05$),见表2。

2.2.2 肝脏、脾脏、肠道及皮肤的移植抗宿主病病理表现 建模后30 d,病理观察结果显示:半相合移植组小鼠的肝细胞肿胀变性,伴有片状灶性坏死、肝血窦扩张,并伴炎性细胞浸润;脾脏可见淤血性改变;小肠部分腺体及局部黏膜上皮可见坏死;皮肤组织基底细胞层空泡变性,可见散在嗜酸性坏死细胞,周围有淋巴细胞浸润符合移植抗宿主病病理改变,见图2。

2.3 各组小鼠肝转移抑制率、肝转移灶数目分级、抑瘤率 结肠癌肝转移模型建立后第30天时探查各组小鼠肝脏,对照组肝转移率达100.0%,环磷酰胺组、全相合移植组、半相合移植组肝转移率分别为87.5%,87.5%及0。结果提示:半相合移植组小鼠的肝转移灶数目明显少于其他3组,且差异具有显著性意义($P < 0.05$),肝转移抑制率及抑瘤率明显高于环磷酰胺组、全相合移植组($P < 0.05$)。环磷酰胺组和全相合移植组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),见表3。

表 1 移植后抗宿主病评分

Table 1 Scores on graft-versus-host disease

观察指标	0分	1分	2分
体质量减轻	<10%	≥10%且≤25%	>25%
活动能力	正常	减弱	静止不动
皮毛	正常	轻度波纹状	色度差, 波纹状
皮肤完整度	正常	脚趾、尾部轻度蜕皮	严重的脱毛
姿势	正常	轻度弓背	严重弓背向上

表注: 总分为 5 项得分相加, 最高 10 分, 最低 0 分。

表 3 各组肝转移抑制率、肝转移灶数目分级、抑瘤率

Table 3 Inhibition rate of hepatic metastasis, number of hepatic metastases, and tumor inhibition rate in each group

组别	肝转移数量				肝转移抑制率	抑瘤率
	0级	1级	2级	3级		
对照组	0	0	0	8	-	-
环磷酸胺组	1	1	2	4	12.5%	36.4%
全相合移植组	1	2	2	3	12.5%	43.6%
半相合移植组	8	0	0	0	100%	100%

表 2 移植后不同时间各组小鼠急性移植抗宿主病评分($\bar{x}\pm s$, n=8)

Table 2 Scores on acute graf-versus-host disease in mice after transplantation

组别	7 d	14 d	28 d
全相合移植组	0.75±0.46	1.50±0.53	1.38±0.52
半相合移植组	1.87±0.64 ^a	3.00±0.75 ^a	2.13±0.64

表注: 与全相合移植组比较, ^aP < 0.05。

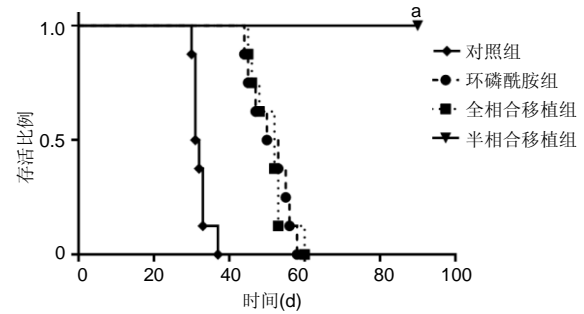


图 1 各组荷瘤小鼠生存时间

Figure 1 Survival time of tumor-bearing mice

图注: 半相合移植组生存时间与对照组、环磷酸胺组、全相合移植组比较, ^aP < 0.05。

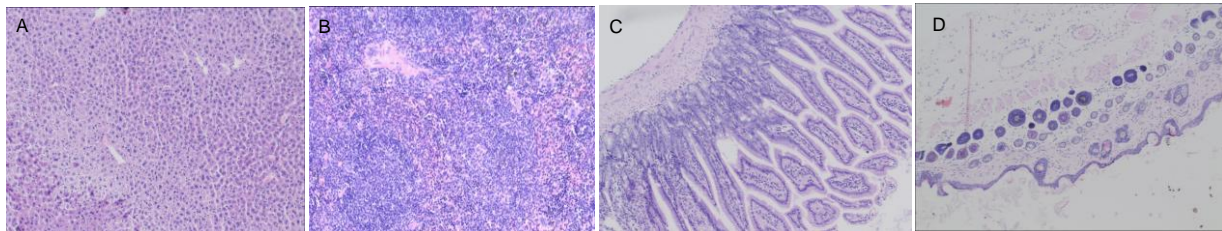


图 2 移植 30 d 后半相合移植组小鼠肝脏(A)、脾脏(B)、小肠(C)、皮肤(D)苏木精-伊红染色(x100)

Figure 2 Pathologic examination of the mouse liver (A), spleen (B), small intestine (C) and skin (D) at 30 days after haploidentical transplantation (hematoxylin-eosin staining, x100)

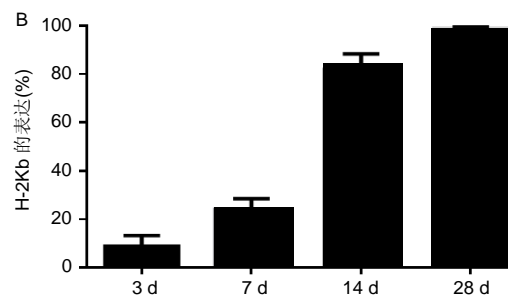
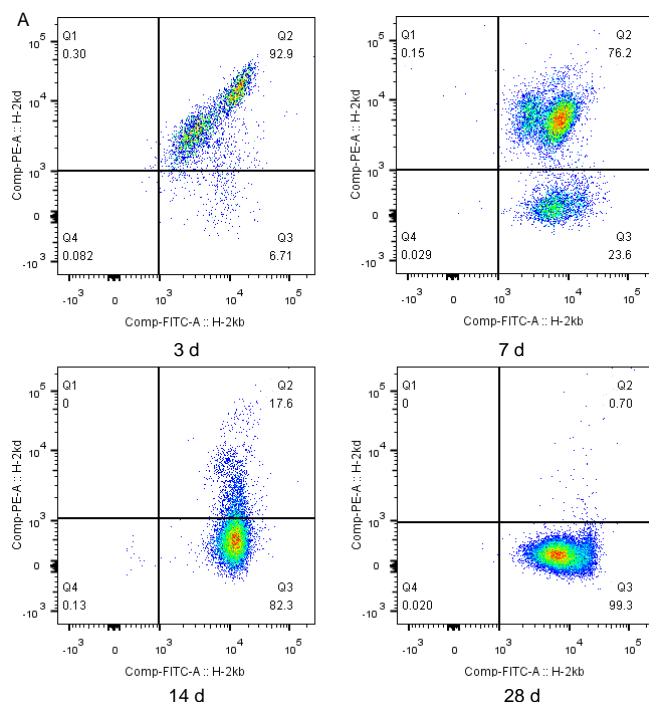


图 3 半相合移植组小鼠外周血细胞 MHC 分子的表达

Figure 3 Expression of MHC molecule in the peripheral blood of mice after haploidentical transplantation

图注: 图中 A 为半相合移植组小鼠在混合细胞移植后 3, 7, 14, 28 d 的外周血流式分析图; B 为混合细胞移植后 3, 7, 14, 28 d 供鼠细胞嵌合率。

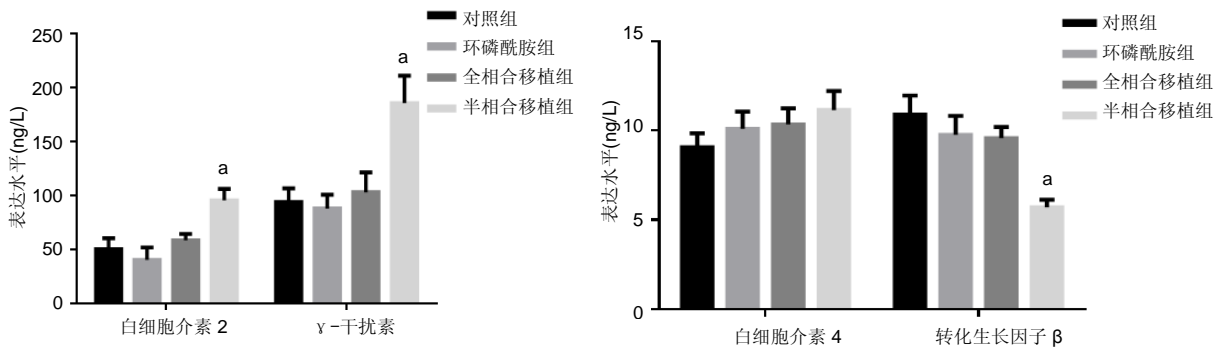


图4 各组小鼠血浆白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 水平

Figure 4 Levels of plasma interleukin-2, interferon- γ , interleukin-4, and transforming growth factor β in mice

图注: 半相合移植组白细胞介素2、 γ -干扰素、转化生长因子 β 的分泌量与对照组、环磷酰胺组、全相合移植组比较, $^aP < 0.05$ 。

2.4 小鼠外周血嵌合率 半相合移植组小鼠在移植后3 d, 仍以自体H-2Kd/b双阳性细胞为主, 移植后7 d, 供鼠H-2Kb单阳性细胞嵌合率增加, 达23.6%; 移植后14 d, 供鼠细胞嵌合率进一步增加, 达到82.3%; 移植后28 d, 供鼠细胞嵌合率达到99.3%, 提示基本取代受鼠细胞(H-2Kd/b双阳性细胞)(图3)。

2.5 外周血白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 水平 见图4。

2.5.1 各组血浆白细胞介素2水平 对照组为(50.500±10.184) ng/L, 环磷酰胺组为(40.625±11.612) ng/L, 全相合移植组为(58.750±6.018) ng/L, 半相合移植组为(95.750±10.634) ng/L, 半相合移植组白细胞介素2的分泌量明显高于其他3组, 且差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.5.2 各组血浆 γ -干扰素水平 对照组为(94.125±12.597) ng/L, 环磷酰胺组为(88.250±12.725) ng/L, 全相合移植组为(103.125±18.419) ng/L, 半相合移植组为(185.625±25.612) ng/L, 半相合移植组 γ -干扰素的分泌量明显高于其他3组, 且差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.5.3 各组血浆白细胞介素4水平 对照组为(9.063±0.275) ng/L, 环磷酰胺组为(10.087±0.340) ng/L, 全相合移植组为(10.337±0.319) ng/L, 半相合移植组为(11.137±0.377) ng/L, 各组白细胞介素4的分泌量差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.5.4 各组血浆转化生长因子 β 水平 对照组为(10.900±0.373) ng/L, 环磷酰胺组为(9.762±0.375) ng/L, 全相合移植组为(9.563±0.222) ng/L, 半相合移植组为(5.688±0.153) ng/L, 半相合移植组转化生长因子 β 的分泌量明显低于其他3组, 且差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

目前异基因造血干细胞移植治疗恶性实体瘤的临床应用都局限在难治性或终末期肿瘤的治疗^[10], Mondino等^[11]研究发现难治性或晚期转移性肿瘤患者本身免疫能力低下及对预处理和治疗的耐受性较差, 且肿瘤负荷较大, 大部分患者需要取得完全性嵌合体才能获得显著疗效, 然而伴随的移植物抗宿主病和感染性疾病使得致死率较高, 阻碍了这种治疗方案的研究和进展。结肠癌发生肝转移概率较

高, 特别对于已经发生局限性肝转移患者行肝切除术后有50%~70%再发肝转移^[12]。异基因造血干细胞移植对结肠癌术后肝转移的预防和治疗在临床以及动物实验中鲜有研究报道, 结肠癌术后肿瘤负荷较小, 此时建立混合型嵌合体可望取得一定疗效。

实验以小鼠为研究对象, 建立小鼠结肠癌肝转移模型后, 静脉输注半相合来源骨髓细胞和脾细胞, 之后接受环磷酰胺非清髓性处理, 再输注供体淋巴细胞。Ghosh等^[13]研究发现输注异基因供体骨髓细胞和淋巴细胞可激活受体对供体抗原起反应的淋巴细胞, 而这些处于激活、增殖状态的淋巴细胞对环磷酰胺特别敏感, 此时接受环磷酰胺处理, 可杀灭大部分受体对供体反应性淋巴细胞以及供体对受体反应性淋巴细胞, 有利于供体骨髓细胞的植入和避免移植物抗宿主病; Chang等^[14]研究表明静脉输注半相合来源骨髓细胞和脾细胞之后再输注供体淋巴细胞可进一步提高供体淋巴细胞水平, 增加对受体肿瘤细胞的杀伤作用。

实验结果显示半相合移植组小鼠结肠癌肝转移抑制率较其他组明显增高, 且抑瘤率明显增加, 生存期明显延长, 与环磷酰胺组及输注全相合来源骨髓细胞和脾细胞相比, 差异有显著性意义。移植7 d后, 供鼠细胞嵌合率逐渐增加; 至移植后28 d, 供鼠细胞基本取代受鼠细胞, 嵌合率达99%以上, 与正常CB6F1小鼠外周血细胞相比, 差异有显著性意义, 由此可见随着骨髓及淋巴细胞移植时间的延长, 供体细胞在受体内的数量不断增加。

Zhanna等^[15]研究表明供者细胞所占比例越高, 其移植物抗肿瘤效应越大, 其复发的可能性越小, 移植物抗宿主病的发生率及程度可能性越大, 同时产生了明显的移植物抗肿瘤效应, 虽然后期产生了严重的移植物抗宿主病, 但抑瘤效果仍较明显。实验发现移植后第7, 14天半相合移植组急性移植物抗宿主病评分高于全相合移植组, 但到第28天两组小鼠急性移植物抗宿主病评分相比差别减小, 但半相合移植组仍表现出了明显移植物抗肿瘤效应, 提示该治疗方案在未产生严重移植物抗宿主病的条件下产生了明显的移植物抗肿瘤效应, 对结肠癌肝转移具有明确的抑制作用。至于移植了全相合骨髓细胞和脾细胞的小鼠并没有产生明显移植物抗肿瘤效应, 考虑是因为供鼠与受鼠为同基因, 不会产生明显的免疫反应。

调节性T细胞(Treg)是CD4⁺ CD25⁺T细胞的一个亚群^[16],在造血干细胞移植后,调节性T细胞具有保留移植抗白血病效应以及防止急性移植物抗宿主病发生的作用,而与之直接相关的指标有白细胞介素2、 γ -干扰素、白细胞介素4、转化生长因子 β 。实验发现输注异基因骨髓细胞联合脾细胞小鼠血浆白细胞介素2、 γ -干扰素分泌量明显高于其他3组,各组白细胞介素4的分泌量无明显差异,转化生长因子 β 的分泌量明显低于其他3组,这表明半相合基因骨髓细胞及脾细胞移植后,具有抗肿瘤效应的Th1型细胞因子白细胞介素2、 γ -干扰素分泌增多, Th2型细胞因子白细胞介素4分泌稍增加、而转化生长因子 β 分泌明显减少,从而诱导了上文所述的抗肿瘤免疫反应,出现了明显的抑瘤效果。

目前利用异基因造血干细胞、淋巴细胞免疫治疗肿瘤机制研究主要集中在移植物抗肿瘤效应上,而对肿瘤转移的抑制机制研究鲜有报道,实验结果证实了经环磷酰胺非清髓处理的异基因骨髓细胞联合淋巴细胞移植在未引起严重移植物抗宿主病的情况下对小鼠可产生移植物抗肿瘤效应,对结肠癌肝转移具有抑制作用,而对肿瘤转移的抑制机制中除了Th1型细胞因子及Th2型细胞因子诱导的抗肿瘤免疫反应外,新生血管形成和营养供给是转移灶继发生长的重要原因,今后的研究可以从该方面进行探讨,丰富此种方案抗肿瘤作用的机制研究。

致谢: 感谢江苏大学基础医学与医学技术免疫学实验室在实验过程中的帮助。

作者贡献: 第一作者进行资料收集、实验设计、实施,第二作者进行实验评估,第一作者成文,通讯作者、第三作者审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81301693)”、“江苏省自然科学基金项目(BK20130474)”、“镇江市社会发展项目(SH2015056)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的干预手段应用了环磷酰胺药物,但是所有作者声明没有接受相关的经费支持,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题: 实验方案经江苏大学动物实验伦理委员会批准,批准号为201603-06。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何

合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Maher B, Ryan E, Little M, et al. The management of colorectal liver metastases. Clin Radiol. 2017;72(8):617-625.
- [2] Aloia TA, Vauthey JN. Management of colorectal liver metastases: past, present, and future. Updates Surg. 2011;63(1):1-3.
- [3] Mantripragada K, Reagan JL, Quesenberry PJ, et al. Advances in cellular therapy for the treatment of leukemia. Discov Med. 2014;17(91):15-24.
- [4] Davies JK, Taussig D, Oakevree H, et al. Long-term survival with low toxicity after allogeneic transplantation for acute myeloid leukaemia and myelodysplasia using non-myeloablative conditioning without T cell depletion. Br J Haematol. 2013;162(4):525-529.
- [5] van Bergen CA, Verdegaal EM, Honders MW, et al. Durable remission of renal cell carcinoma in conjuncture with graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusion: rule or exception. PLoS One. 2014;9(1):e85198.
- [6] Hardy NM, Mossoba ME, Steinberg SM, et al. Phase I trial of adoptive cell transfer with mixed-profile type-I/type-II allogeneic T cells for metastatic breast cancer. Clin Cancer Res. 2011;17(21):6878-6887.
- [7] Aglietta M, Barkholt L, Schianca FC, et al. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in metastatic colorectal cancer as a novel adoptive cell therapy approach. The European group for blood and marrow transplantation experience. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15(3):326-335.
- [8] De Koning C, Nierkens S, Boelens JJ. Strategies before, during, and after hematopoietic cell transplantation to improve T-cell immune reconstitution. Blood. 2016;128(23):2607-2615.
- [9] 王理,文西年,高华,等. 结肠癌肝转移模型构建方法的优化[J].中国组织工程研究,2014,18(36):5855-5860.
- [10] Shook DR, Triplett BM, Srinivasan A, et al. Successful allogeneic hematopoietic cell engraftment after a minimal conditioning regimen in children with relapsed or refractory solid tumors. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(2):291-297.
- [11] Mondino A, Vella G, Icardi L. Targeting the tumor and its associated stroma: One and one can make three in adoptive T cell therapy of solid tumors. Cytokine Growth Factor Rev. 2017;36:57-65.
- [12] Heise D, Bayings W, Tuinhof A, et al. Long-term outcome and quality of life after initial and repeat resection of colorectal liver metastasis: A retrospective analysis. Int J Surg. 2017;48:281-285.
- [13] Ghosh N, Ye X, Tsai HL, et al. Allogeneic Blood or Marrow Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Multiple Myeloma. Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23(11):1903-1909.
- [14] Chang YJ, Huang XJ. Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation: when, if and for whom. Blood Rev. 2013;27(1):55-62.
- [15] Zhanna Y, Ester H, Lola W, et al. Multidonor bone marrow transplantation improves donor engraftment and increases the graft versus tumor effect while decreasing graft-versus-host disease. Transpl Int. 2011;24(2):194-200.
- [16] Delia M, Pastore D, Mestice A, et al. Outcome of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation by donor graft CD3+/Tregs ratio: a single-center experience. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(3):495-499.