

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.008

· 基础研究 ·

## 环磷酰胺联合照射后半相合淋巴细胞对小鼠肝癌移植瘤的抑制作用

汤志伟<sup>1,2,3</sup>, 李洁羽<sup>2,3</sup>, 彭峰<sup>2,3</sup>, 赵坤<sup>1,2,3</sup>, 周智锋<sup>2,3</sup>, 陈明水<sup>2,3</sup>, 叶韵斌<sup>▲2,3</sup>, 陈强<sup>1,3</sup> (1. 福建医科大学 附属协和医院 肿瘤内科, 福建 福州 350001; 2. 福建医科大学 附属省肿瘤医院 肿瘤免疫学实验室, 福建 福州 350014; 3. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)

**[摘要]** **目的:** 观察不同剂量环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)预处理联合5 Gy <sup>60</sup>Co 照射的半相合淋巴细胞输注(haploidentical lymphocyte infusion, HLI)对小鼠肝癌移植瘤的抑制作用。**方法:** 以皮下接种 Hepa1-6 肝癌细胞的 BABL/c × C57BL 杂交 F1 代雌性小鼠(表型为 H-2<sup>b/d</sup>)为受鼠, 以 BALB/c × C3H 杂交 F1 代雌性小鼠(表型为 H-2<sup>d/k</sup>)为 MHC 半相合的供者, 分 PBS 组、CTX 80 mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组、CTX 200 mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组、CTX 300 mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组、5 Gy 照射 HLI 组, 每组 5 只小鼠; 观察各组小鼠瘤块生长和大小, 检测受鼠体内的嵌合状态及移植物抗宿主病(graft-versus host disease, GVHD)的发病情况。**结果:** 80、200 mg CTX 联合 HLI 组小鼠瘤块体积小于 PBS 组[(1.25 ± 0.24)、(1.38 ± 0.31) vs (2.03 ± 0.24) cm<sup>3</sup>, *P* < 0.01], 小鼠生存时间显著长于 PBS 组[48 d(39 d, 55 d), 40 d(35 d, 48 d) vs 35 d(18 d, 39 d), *P* < 0.05]; 80 mg CTX 联合 HLI 组的抑瘤作用强于单纯 HLI 组[(1.25 ± 0.24) vs (1.76 ± 0.40) cm<sup>3</sup>, *P* < 0.05]; 300 mg CTX 联合 HLI 组和单纯 HLI 组无明显抑瘤作用。各治疗组小鼠均未出现 GVHD。80、200 mg CTX 联合 HLI 组小鼠嵌合度低于 300 mg CTX 联合 HLI 组, 且消失时间明显早于后者。**结论:** 低剂量 CTX 联合输注经照射的半相合供者淋巴细胞可获得较好的抗小鼠肝癌移植瘤的作用, CTX 剂量增加后抗肿瘤作用并未增强。

**[关键词]** 肝癌; 半相合淋巴细胞; 照射; 环磷酰胺; 嵌合体

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)01-0045-07

## Inhibitory effect of cyclophosphamide combined with irradiated haploidentical lymphocyte infusion on transplanted hepatocellular carcinoma in mice

TANG Zhi-wei<sup>1,2,3</sup>, LI Jie-yu<sup>2,3</sup>, PENG Feng<sup>2,3</sup>, ZHAO Shen<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Zhi-feng<sup>2,3</sup>, CHEN Ming-shui<sup>2,3</sup>, YE Yun-bin<sup>2,3</sup>, CHEN Qiang<sup>1,3</sup> (1. Department of Oncology Medicine, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China; 2. Laboratory of Tumor Immunology, Fujian Provincial Cancer Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 3500014, Fujian, China; 3. Key Laboratory of Tumor Translational Medicine of Fujian Province, Fuzhou 3500014, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the effect of irradiated haploidentical lymphocyte infusion (HLI) following different doses of cyclophosphamide (CTX) on hepatocellular carcinoma Hepa1-6 cells. **Methods:** Female (BABL/c × C57BL) → F1 (CB6F1 H-2<sup>b/d</sup>) mice were subcutaneously inoculated with Hepa1-6 cells to develop a solid tumor model that was taken as recipients. The irradiated haploidentical lymphocytes were from the female (BALB/c × C3H) → F1 (CC3HF1 H-2<sup>d/k</sup>). All the mice were divided to five groups: group PBS, group CTX 80 mg/kg + SP/irr (spleen lymphocyte/5Gy irradiated), group CTX 200 mg/kg + SP/irr, group CTX 300 mg/kg + SP/irr and group SP/irr. The tumor size was measured every 2–3 days. The chimerism was measured after HLI, and the graft-versus host disease (GVHD) was assessed. **Results:** The tumor was significantly suppressed in group CTX 80 mg/kg + SP/irr and group CTX 200 mg/kg + SP/irr compared

**[基金项目]** 福建省科技厅科研基金资助项目(No. 2009Y0012)。Project supported by the Science Research Foundation of Science and Technology Bureau of Fujian Province (No. 2009Y0012)

**[作者简介]** 汤志伟(1982–), 湖北省襄阳市人, 硕士生, 医师, 主要从事肝癌的基础和临床研究。E-mail: gctangzw@sina.com

**[通信作者]** 陈强(CHEN Qiang, corresponding author), E-mail: Cqiang8@pub5.fj.fz.cn; 叶韵斌(YE Yun-bin, co-corresponding author), E-mail: yunbin\_ye@yahoo.com, ▲共同通信作者

**[网络出版]** http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120109.1653.003.html

with group PBS ( $[1.25 \pm 0.24] \text{ cm}^3$ ,  $[1.38 \pm 0.31] \text{ cm}^3$  vs  $[2.03 \pm 0.24] \text{ cm}^3$ ,  $P < 0.01$ ), so was the survival time (48 d [39 d, 55 d], 40 d [35 d, 48 d] vs 35 d [18 d, 39 d],  $P < 0.05$ ), of which, group CTX 80 mg/kg + SP/irr got significantly different antitumor effect from the group SP/irr ( $[1.25 \pm 0.24] \text{ cm}^3$  vs  $[1.76 \pm 0.40] \text{ cm}^3$ ,  $P < 0.05$ ). GVHD was not found in any groups. The chimerism of group 80 mg and 200 mg CTX combining with HLI was lower than group CTX 300 mg combining with HLI and the disappearance time was shorter. **Conclusion:** Transplantation of irradiated haploidentical lymphocytes following low doses of CTX can induce antitumor effect on hepatocellular carcinoma of mice. Higher doses of CTX may not increase antitumor effect.

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma; haploidentical lymphocyte; irradiation; cyclophosphamide; chimerism

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 45-51 ]

Kolb 等<sup>[1]</sup>首次报道了在骨髓预处理条件下, 采用供者淋巴细胞输注 (donor lymphocyte infusion, DLI) 治疗造血干细胞移植后复发的慢性粒细胞白血病, 产生了显著的移植物抗白血病作用 (graft versus leukemia, GVL), 认识到供者淋巴细胞输注或转基因造血干细胞移植是通过免疫反应起抗肿瘤作用的。但由于骨髓预处理伴发严重的移植相关毒性反应和较高的死亡率, 非骨髓造血干细胞移植 (non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation, NST) 近年来越来越广泛地应用于血液系统肿瘤及实体瘤的治疗<sup>[2]</sup>。Eto 等<sup>[3]</sup>发现, 采用环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX; 200 mg/kg) 诱导的 NST 抗小鼠肾癌作用明显优于采用全身放疗 (total body irradiation, TBI) 预处理的方式。CTX 可以很好地清除供者来源的针对受者的反应性 T 细胞和受者来源的针对供者的反应性 T 细胞, 可以诱导一种稳定的混合嵌合状态 (mixed chimerism, MC) 和免疫耐受。陈强等<sup>[4]</sup>研究发现, 在低剂量 CTX (80 mg/kg) 预处理的条件下采用照射半相合淋巴细胞输注 (haploidentical lymphocyte infusion, HLI) 也同样获得很好的抗小鼠肝癌的作用, 而且可以预防移植物抗宿主病 (graft-versus host disease, GVHD) 的发生。目前关于 CTX 预处理的剂量存在争议, 本实验探讨不同剂量 CTX 预处理小鼠后给予照射的 HLI 的抗肿瘤作用, 以期寻找最适的 CTX 预处理剂量。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验动物和器材

受鼠为清洁级近交系杂交 CB6F1 (BABL/c × C57BL/6 的杂交子一代, H-2<sup>b/d</sup>) 雌性小鼠; 供鼠为清洁级近交系杂交 CC3HF1 (BABL/c × C3H 的杂交子一代, H-2<sup>d/k</sup>) 雌性小鼠。小鼠均为 8~10 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [动物合格证号为 SCXK (京) 2006-0009]。所有动物均饲养于福建医科大学实验动物中心。Hep1-6 细胞株 (H-2b) 购于

中国科学院细胞库 (目录号为 TCM30), 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中。PE 标记的小鼠 H-2K<sup>b</sup> 单抗和 FITC 标记的小鼠 H-2K<sup>k</sup> 单抗购于 BD 公司, CTX 注射液购于江苏恒瑞药业公司。FACS Calibur 流式细胞仪购于美国 BD 公司, T-1000 型<sup>60</sup>Co 治疗机购于加拿大瓦立安公司。

### 1.2 受鼠实体瘤模型的建立

Hep1-6 细胞培养、收集后用无血清的 DMEM 培养液配成  $4 \times 10^7$ /ml 细胞悬液, 0.1 ml/只接种到 CB6F1 小鼠右侧腋窝皮下, 每 2~3 d 使用游标卡尺测量肿瘤的最大长径和与之垂直的短径, 瘤体体积计算公式为  $V = 1/2 \text{ 长径} \times \text{短径}^2 (\text{mm}^3)$ 。

### 1.3 供鼠细胞的制备和照射

脱颈处死 CC3HF1 小鼠, 75% 酒精中浸泡 5 min, 于超净台中取出小鼠脾脏, 采用梳刮法制备脾细胞悬液, 然后经过滤网过滤 (BD Falcon 2350), 加入 0.16 mol/L 的 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 裂解, 离心后重悬, 调整细胞密度至  $6 \times 10^8$  个/ml, 备用。供鼠细胞照射方案: 剂量为 5 Gy, 照射时间为 10 min, 剂量率为 0.5 Gy/min, 照射野为 10 cm × 10 cm, 放射源与细胞间距离 50 cm、深度 1 cm。

### 1.4 实验小鼠的处理与分组

化疗预处理的方法: 于接种瘤细胞后第 4 天 (该天定位输注第 -1 天) 给予腹腔 CTX 化疗, 接种后第 5 天给予照射后半相合供者淋巴细胞输注 (该天定位输注第 0 天, 输注  $9 \times 10^7$  个/只)。具体分为 5 组: PBS 组、CTX 80mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组 [CTX 80 mg/kg + SP/irr (照射半相合脾淋巴细胞)], CTX 200 mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组 (CTX 200 mg/kg + SP/irr)、CTX 300 mg/kg + 5 Gy 照射 HLI 组 (CTX 300 mg/kg + SP/irr)、5 Gy 照射 HLI 组 (SP/irr)。25 只小鼠, 使用随机数字表法, 分为 5 组, 每组 5 只小鼠。另设指标检测小鼠 60 只, 按随机数字表法分配至 5 组, 每组 12 只小鼠, 处理方式与各实验组对应, 分别用来进行各组嵌合体、外周血白细

胞、脾细胞、病理学检查。

### 1.5 小鼠一般情况、生存时间和 GVHD 的观察

从接种肿瘤细胞开始,观察小鼠肿瘤生长情况,并根据小鼠有无出现弓背、耸毛、倦怠、食欲减退、毛发无光泽、脱毛、步态不稳、腹泻、体重下降等症状,判断 GVHD 的发生情况。每 2~3 d 使用游标卡尺测量肿瘤的最大长径和与之垂直的短径,按公式计算瘤体积,并记录小鼠生存时间。

### 1.6 流式细胞术检测 CTX 预处理联合 HLI 各组小鼠的嵌合体

分别于输注后第 1、3、5、7、10 天取各组小鼠脾脏,制备脾细胞悬液(方法如前),分别用 PE 标记抗小鼠 H-2K<sup>b</sup> 和 FITC 标记的抗小鼠 H-2K<sup>k</sup>,上流式细胞仪检测小鼠的嵌合体。

### 1.7 H-E 染色观察 CTX 预处理联合 HLI 各组小鼠的病理改变

分别于输注后第 1、2、3、4 天,取各 HLI 组的小鼠的肝、脾、肺、小肠、皮肤、瘤组织,浸泡于 10% 甲醛中,石蜡固定,切片 5 μm/片,H-E 染色,观察小鼠主要器官的病理改变情况。

### 1.8 外周血细胞计数及脾细胞计数

分别于输注的第 -2、-1、1、3、10、12 天取外周血 20 μl,加入 380 μl 冰醋酸中,室温反应 15 min,然后光镜下计数白细胞;制备小鼠脾细胞(方法如前),光镜下计数。

### 1.9 统计学处理

计量资料正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,偏态分布数据以中位数(最小值,最大值)表示;计数资料以率来表示。采用 SPSS13.0 软件。对各组数据进行方差齐性者检验(Levene 检验)及正态性检验(*F* 检验);符合正态分布及方差齐性者采用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较;不符合正态分布者,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。*P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 低剂量 CTX 联合 HLI 有较强的抗肿瘤作用

实验结果(图 1)显示,CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、CTX 200 mg/kg + SP/irr 组与 PBS 组相比有明显的抗肿瘤作用[(1.25 ± 0.24)、(1.38 ± 0.31) vs (2.03 ± 0.24) cm<sup>3</sup>, *P* < 0.01];CTX 300 mg/kg + SP/irr 组、SP/irr 组与 PBS 组相比无抗肿瘤作用(*P* > 0.05)。组间比较显示,CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、CTX 200 mg/kg + SP/irr 组的抗肿瘤作用无明显

差异(*P* > 0.05),CTX 200 mg/kg + SP/irr 组、SP/irr 组抗肿瘤作用无明显差异(*P* > 0.05),CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、SP/irr 组两组之间的差异有统计学意义[(1.25 ± 0.24) cm<sup>3</sup> vs (1.76 ± 0.40) cm<sup>3</sup>, *P* < 0.05]。结果显示,低剂量 CTX 预处理即可获得较好抗肿瘤作用,增大 CTX 剂量后联合 HLI 的抗肿瘤作用并未相应增强。

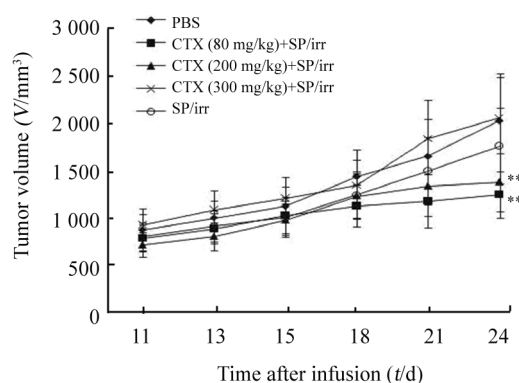


图 1 不同剂量 CTX 预处理接受 HLI 的抗肿瘤作用

Fig. 1 Antitumor effect of HLI following different doses of CTX

\*\* *P* < 0.01 vs PBS

### 2.2 低剂量 CTX 联合 HLI 延长荷瘤小鼠生存时间

CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、CTX 200 mg/kg + SP/irr 组中位生存时间与 PBS 组相比,有明显延长[48 d (39 d, 55 d)、40 d (35 d, 48 d) vs 35 d (18 d, 39 d), *P* < 0.05];CTX 300 mg/kg + SP/irr 组、SP/irr 组的中位生存期分别为 35 d (21 d, 45 d)、40 d (18 d, 47 d),与 PBS 组相比无明显差别(*P* > 0.05)。

### 2.3 CTX 联合 HLI 的各组小鼠的 GVHD 情况

CTX 200 mg/kg + SP/irr 组、CTX 300 mg/kg + SP/irr 组于化疗后第 2 天开始出现倦怠、食欲不振、毛发无光泽、脱毛、步态不稳、体质量明显下降(*P* < 0.05,图 2)等症状;其余各组未见明显的体质量下降。病理学检查显示,CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、CTX 200 mg/kg + SP/irr 组、CTX 300 mg/kg + SP/irr 组、SP/irr 组等 4 组小鼠的肝脏见轻度水肿,并有少量淋巴细胞浸润,随着化疗剂量的增大,肝脏水肿程度增强;脾脏、皮肤、小肠组织结构基本正常,仅有少量淋巴细胞浸润(图 3)。结果提示,CTX 200 mg/kg + SP/irr 组、CTX 300 mg/kg + SP/irr 组两组小鼠体质量下降主要由于化疗剂量较大所致。

### 2.4 CTX 联合 HLI 后各组小鼠的嵌合体分析

于 HLI 输注后第 1、2、3、4、5、7、10 天分别用流

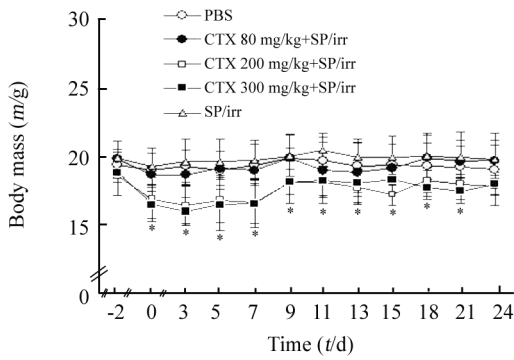


图2 CTX联合处理后HLI各组小鼠的体质量变化  
 Fig.2 Body mass changes of mice in different groups after combination of CTX and HLI treatment  
 \*  $P < 0.05$  vs PBS

式细胞术检测各HLI输注组的嵌合体。受者小鼠的MHC表型为H-2<sup>b/d</sup>,供者小鼠的MHC表型为H-2<sup>d/k</sup>,通过检测H-2b、H-2k表型的表达,来了解供者与受者细胞共存的嵌合状态。结果(图4、5)显示,CTX 80 mg/kg + SP/irr组、CTX 200 mg/kg + SP/irr组、CTX 300 mg/kg + SP/irr组、5Gy照射半相合组输注后第1天的嵌合度分别为1.36%、4.51%、11.08%、0.78%;前2组的嵌合度逐渐下降,于4 d内嵌合体全部消失;CTX 300 mg/kg + SP/irr组于HLI后第5天嵌合度仍为6.24%,直到HLI输注后第7天才消失(数据未显示)。结果说明,随着化疗预处理的剂量加大,嵌合度升高,嵌合体维持时间延长。

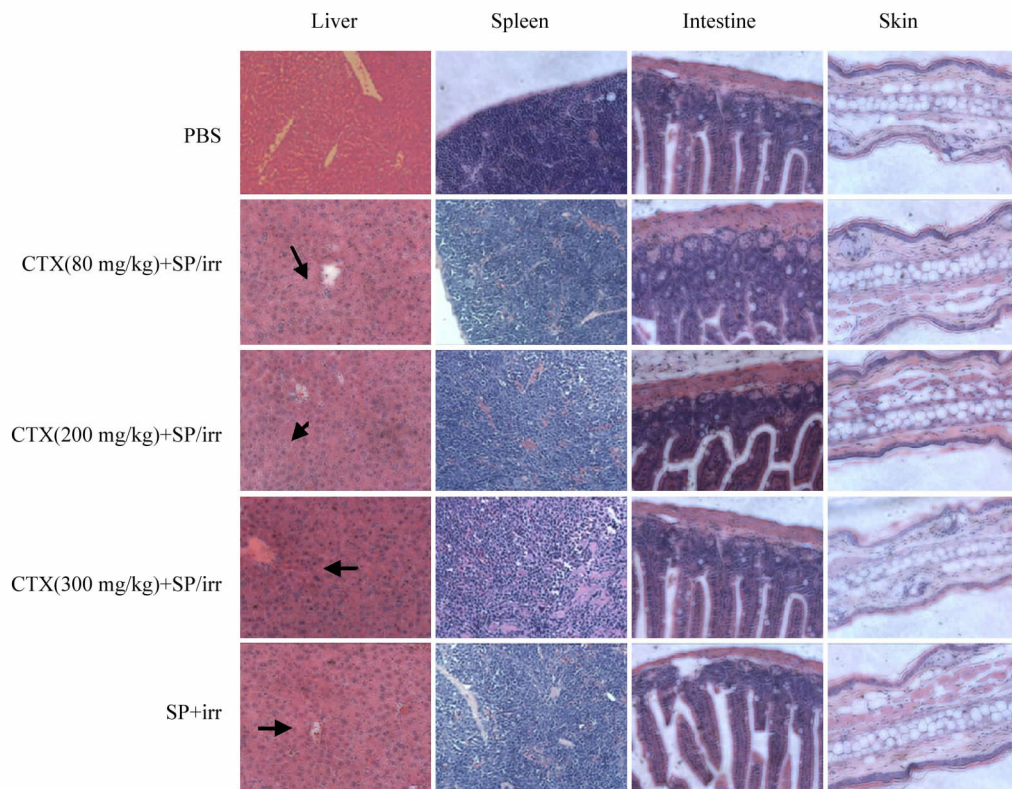


图3 CTX联合HLI处理后的各组小鼠GVHD情况(H-E, × 100)  
 Fig.3 GVHD of mice in different groups after combination of CTX and HLI treatment( H-E, × 100 )  
 Arrows indicate edema

2.5 CTX联合HLI后各组小鼠外周血白细胞数和脾细胞数的变化

输注后第1天各化疗组小鼠脾细胞数开始下降,第3天降至最低,而后,CTX 80 mg/kg + SP/irr组、CTX 200 mg/kg + SP/irr组两组脾细胞数逐渐上升;PBS组脾细胞数无明显变化。在输注后12 d,脾细胞数明显高于PBS组[ ( 32.9 ± 5.98 ) × 10<sup>7</sup> 个/ml

vs ( 12.2 ± 3.2 ) × 10<sup>7</sup> 个/ml; ( 25.3 ± 6.02 ) × 10<sup>7</sup> 个/ml vs ( 12.2 ± 3.2 ) × 10<sup>7</sup> 个/ml ,  $P < 0.01$  ]。

输注后-1 d化疗组白细胞开始下降,输注后第3天降至最低;PBS组白细胞数无明显变化。输注后第12天检测见CTX 80 mg/kg + SP/irr组白细胞数明显升高,与PBS组相比差异有统计学意义 [ ( 7.6 ± 1.52 ) × 10<sup>9</sup> 个/ml vs ( 2.9 ± 7.23 ) × 10<sup>9</sup>

个/ml,  $P < 0.01$ ]; CTX 200 mg/kg + SP/irr 组、CTX 300 mg/kg + SP/irr 组低于 PBS 组[  $(1.9 \pm 0.35) \times 10^9$  个/ml vs  $(2.9 \pm 7.23) \times 10^9$  个/ml;  $(0.4 \pm 0.08) \times 10^9$  个/ml vs  $(2.9 \pm 7.23) \times 10^9$  个/ml,  $P < 0.01$  ]。由此可见,低剂量化疗组小鼠的脾细胞及白细胞恢复较快,且于输注后 12 d 脾细胞及外周血白细胞明显升高。

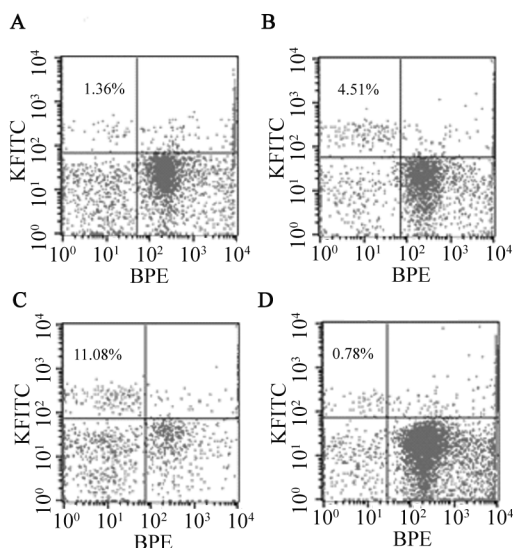


图 4 CTX 联合 HLI 处理后 1 d 各组小鼠的嵌合体

Fig. 4 Chimerism of mice in different groups 1 d after combination of CTX and HLI treatment

A: CTX 80 mg/kg + SP/irr; B: CTX 200 mg/kg + SP/irr; C: CTX 300 mg/kg + SP/irr; D: SP/irr

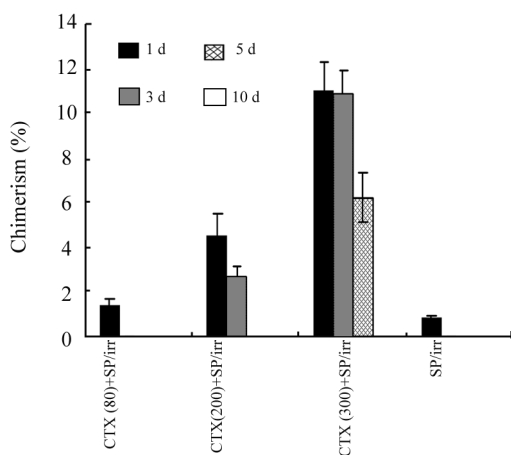


图 5 CTX 联合 HLI 处理后各组小鼠的嵌合体

Fig. 5 Chimerism of mice in different groups after combination of CTX and HLI treatment

### 3 讨论

异基因造血干细胞移植最早应用于难治性血液系统肿瘤,通过清髓性放化疗的预处理,尽可能杀灭白血病细胞,然后进行自体或完全相和的异体骨髓移植,以恢复宿主的造血系统。但大剂量的放化疗仍然不能彻底清除白血病细胞,因而复发率较高<sup>[5-6]</sup>。尽管在异基因骨髓移植中存在 GVHD,但同时也显著降低了肿瘤复发率,这使学者们认识到供者细胞介导的免疫反应起到抗肿瘤作用,即移植物产生抗肿瘤作用(graft versus tumor, GVT)。

Kolb 等<sup>[1]</sup>针对复发的慢性粒细胞白血病患者采用供者淋巴细胞输注使得患者再次达到完全缓解(complete response, CR),直接证明了 GVL 的作用。在此基础上发展起来的降低强度的预处理<sup>[7]</sup>或非清髓预处理<sup>[8]</sup>的造血干细胞移植,也取得了良好的治疗效果。2000 年 Childs 等<sup>[9]</sup>应用 NST 治疗肾癌。在 CTX(200 mg/mg)预处理的非清髓条件下,HLI 输注形成了很低的嵌合体,但是抗肿瘤效果却很显著,在嵌合体消失的情况下,仍可观察到持续的抗肿瘤作用。本研究建立的半相合的 CC3HF1(表型 H-2<sup>d/k</sup>)-CB6F1(表型 H-2<sup>b/d</sup>)小鼠移植模型中也出现了这种现象<sup>[9]</sup>。因此,本课题探讨在异基因免疫细胞治疗实体瘤中是否需要大剂量的预处理。结果显示,低剂量的预处理获得很低的嵌合度,但是却具有较好抗肿瘤作用(CTX 80 mg/kg + SP/irr 组、CTX 200 mg/kg + SP/irr 组两组),生存期明显延长;相反,CTX 300 mg/kg + SP/irr 组获得了很高的嵌合体(嵌合度为 11.08%),却无明显抗肿瘤的作用,小鼠生存时间较短。在实验中也尝试 400 mg/kg CTX 处理小鼠,但组中的小鼠很快发生死亡,可见 400 mg/kg 的 CTX 对小鼠是致死性的剂量(数据未显示)。同时,随着化疗剂量的增大,宿主小鼠脾细胞及外周血白细胞恢复减慢。SP/irr 组没有观察到抗肿瘤作用。CTX 300 mg/kg + SP/irr 组与 SP/irr 组抗肿瘤作用差别无统计学意义。这些结果表明:(1)肝癌对化疗不敏感。(2)宿主经过化疗预处理才具有抗肿瘤作用,CTX(80 mg/kg)预处理可以明显提高经 5Gy <sup>60</sup>Co 照射的 HLI 的抗肿瘤作用。(3)在异基因免疫细胞移植(无造血干细胞支持)治疗肝癌时高水平的嵌合体并不是必须的,在嵌合体消失的情况下仍然观察到抗肿瘤作用,提示宿主免疫系统是抗肿瘤的的主体,宿主免疫状态的恢复是影响机体抗肿瘤的重要因素。

在 GVHD 观察中发现,CTX 200 mg/kg + SP/irr

组、CTX 300 mg/kg + SP/irr 组两组于输注后第 1 天出现体重下降,第 3 天体重降至最低,但病理学检查未发现组织中有明显淋巴细胞浸润,提示体重下降、倦怠、弓背可能为化疗所致。Strair 等<sup>[11]</sup>报道,不经预处理,但经 25 Gy 射线照射后的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 部分相合外周血单个核细胞输注,治疗复发及难治性肾癌等肿瘤患者,结果 15 例患者中 3 例出现免疫应答,同时未出现 GVHD。Edmund 等<sup>[12]</sup>研究发现,T 细胞经 5 Gy 照射即可失去增殖能力,而保留杀伤能力。陈强等<sup>[4]</sup>也报道经 7.5 Gy 照射的淋巴细胞保留 GvT,而不出现 GVHD<sup>[4]</sup>,Zhao 等<sup>[13]</sup>发现输注经 SP/irr 脾淋巴细胞在保留抗肿瘤作用同时也未出现明显 GVHD。本实验中也观察到同样的现象,经 5 Gy 照射后的半相合脾淋巴细胞输注,可以明显地减轻 GVHD 的发生,可见该方法是安全的。

异基因移植抗肿瘤的机制目前还不明了。供者淋巴细胞输注所产生的直接的 GVT 作用已经得到广泛的证实<sup>[1]</sup>。Waller 等<sup>[14]</sup>证实,在非清髓造血干细胞移植治疗实体瘤中供者 CD4<sup>+</sup>T 及受者 CD8<sup>+</sup>T 起主要作用。Rubio 等<sup>[15]</sup>在非清髓预处理 + 受者淋巴细胞输注情况下也观察到受者的 CD8<sup>+</sup>T 细胞是主要抗肿瘤成分。输注同种异基因淋巴细胞可以诱导小鼠体内淋巴细胞大量活化增殖,产生大量的 I 型细胞因子 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), 诱导小鼠的抗肿瘤作用<sup>[16]</sup>。输注灭活的白细胞,可以在小鼠体内产生混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR), 诱导“细胞因子风暴”产生大量 Th1 细胞因子 (IL-2, IFN- $\gamma$ ), 介导抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。这些研究都表明,宿主自身参与了抗肿瘤作用,并且起着主要作用。

本实验中低剂量 CTX 预处理组宿主的免疫状态恢复较早,因此抗肿瘤作用明显,而无 CTX 预处理组没观察到抗肿瘤作用,可能是因为化疗预处理后给供者淋巴细胞一个存活的空间,可以与宿主淋巴细胞发生混合淋巴细胞反应,刺激宿主的淋巴细胞大量增殖,产生大量的 I 型细胞因子,诱导抗肿瘤作用;同时低剂量的 CTX 联合过继免疫细胞治疗,可以促使淋巴细胞向肿瘤组织中迁徙<sup>[18]</sup>及减少宿主体内的 Treg 细胞<sup>[19-22]</sup>,更好地发挥抗肿瘤作用。因此,低剂量的 CTX 预处理后输注 5 Gy <sup>60</sup>Co 照射过的半相合供者淋巴细胞可以起到良好的抗肿瘤作用,而且不引起 GVHD。该方法具有良好的临床应用前景。然而宿主免疫状态及输注的供者淋巴细胞的数量对抗肿瘤作用是否有影响,还需进一步探索。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Kolb HJ, Mittermueller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients [ J ]. *Blood*, 1990, 76 ( 12 ): 2462-2465.
- [ 2 ] Chen Q, Lin RB, Ye YB, et al. The combined administration of partially HLA-matched irradiated allogeneic lymphocytes and thalidomide in advanced renal-cell carcinoma: A case report [ J ]. *Med Oncol*, 2010, 27 ( 2 ): 554-558.
- [ 3 ] Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, et al. Posttransplant administration of cyclophosphamide and donor lymphocyte infusion induces potent antitumor immunity to solid tumor [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 ( 9 ): 2833-2840.
- [ 4 ] 陈强, 李晓峰, 叶韵斌, 等. MHC 半相合脾加骨髓细胞诱发 H22 荷瘤鼠的抗肿瘤效应 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13 ( 2 ): 107-111.
- [ 5 ] Weiden PL, Flourmoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts [ J ]. *N Engl J Med*, 1979, 300 ( 19 ): 1068-1073.
- [ 6 ] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation [ J ]. *Blood*, 1990, 75 ( 3 ): 555-562.
- [ 7 ] Mohty M, Labopin M, Tabrizi R, et al. Reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation [ J ]. *Haematologica*, 2008, 93 ( 2 ): 303-306.
- [ 8 ] Imamura M and Tanaka J. Graft-versus-leukemia effect of nonmyeloablative stem cell transplantation [ J ]. *Korean J Intern Med*, 2009, 24 ( 4 ): 287-298.
- [ 9 ] Childs R, Chernoff A, Contentin N, et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation [ J ]. *N Engl J Med*, 2000, 343 ( 11 ): 750-758.
- [ 10 ] Harano M, Eto M, Iwai T, Tatsugami K, et al. Renal cancer treatment with low levels of mixed chimeris induced by nonmyeloablative regimen using cyclophosphamide in mice [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65 ( 21 ): 10032-10040.
- [ 11 ] Strair RK, Schaar D, Medina D, et al. Antineoplastic effects of partially HLA-matched irradiated blood mononuclear cells in patients with renal cell carcinoma [ J ]. *J Clin Oncol*, 2003, 21 ( 20 ): 3785-3791.
- [ 12 ] Waller EK, Ship AM, Mittelstaedt S, et al. Irradiated donor leukocytes promote engraftment of allogeneic bone marrow in major histocompatibility complex mismatched recipients without causing graft-versus-host disease [ J ]. *Blood*, 1999, 94 ( 9 ): 3222-3233.
- [ 13 ] Zhao S, Li JY, Zheng XB, et al. Irradiated haploidentical donor leukocyte infusions as an adoptive immunotherapy strategy to induce host-versus-tumor effects [ J ]. *Tumori*, 2011, 97 ( 4 ): 522-531.
- [ 14 ] Kamiryo Y, Eto M, Yamada H, Yajima T, et al. Donor CD4 T cells are critical in allogeneic stem cell transplantation against mu-

- rine solid tumor [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69: ( 12 ): 5151-5158.
- [ 15 ] Rubio MT, Saito TI, Kattleman K, et al. Mechanisms of the anti-tumor responses and host-versus-graft reactions induced by recipient leukocyte infusions in mixed chimeras prepared with nonmyeloablative conditioning: A critical role for recipient CD4<sup>+</sup> T cells and recipient leukocyte infusion-derived IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells [ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 2 ): 665-676.
- [ 16 ] Kroczek RA, Black CD, Barbet J, et al. Induction of IL-2 receptor expression *in vivo*. Response to allogeneic cells [ J ]. *Transplantation*, 1987, 44( 4 ): 547-553.
- [ 17 ] Su X, Guo S, Zhou C, Wang D, et al. A simple and effective method for cancer immunotherapy by inactivated allogeneic leukocytes infusion [ J ]. *Int J Cancer*, 2009, 124( 5 ): 1142-1151.
- [ 18 ] Bracci L, Moschella F, Sestili P, et al. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation and specific tumor infiltration [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 2 ): 644-653.
- [ 19 ] Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, et al. Inhibition of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [ J ]. *Blood*, 2005, 105( 7 ): 2862-2868.
- [ 20 ] Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative [ J ]. *Eur J Immunol*, 2004, 34( 2 ): 336-344.
- [ 21 ] Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells [ J ]. *J Exp Med*, 2004, 200( 6 ): 771-782.
- [ 22 ] Burton JH, Mitchell L, Thamm DH, et al. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma [ J ]. *J Vet Intern Med*, 2011, 25( 4 ): 920-926.
- [ 收稿日期 ] 2011 - 08 - 30      [ 修回日期 ] 2011 - 11 - 19  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 简 讯 ·

### 2010 年国内论文被引用次数较多的医院

| 排序 | 单 位             | 被引用次数  | 论文增长趋势( % ) |
|----|-----------------|--------|-------------|
| 1  | 解放军总医院          | 12 603 | -10.6       |
| 2  | 北京协和医院          | 7 617  | 11.7        |
| 3  | 四川大学华西医院        | 6 191  | -28.8       |
| 4  | 北京大学第一医院        | 5 594  | 13.7        |
| 5  | 华中科技大学附属同济医院    | 5 492  | -3.3        |
| 6  | 中山大学第一附属医院      | 4 494  | -12.6       |
| 7  | 南京军区南京总医院       | 4 404  | -15.4       |
| 8  | 第二军医大学长海医院      | 4 375  | 3.7         |
| 9  | 华中科技大学附属协和医院    | 4 203  | -23.3       |
| 10 | 南方医科大学附属南方医院    | 4 153  | -8.1        |
| 11 | 上海交通大学医学院附属瑞金医院 | 4 058  | -0.3        |
| 12 | 第三军医大学西南医院      | 3 915  | -15.3       |
| 13 | 第四军医大学西京医院      | 3 894  | -15.5       |
| 14 | 北京大学人民医院        | 3 771  | 2.4         |
| 15 | 南京医科大学第一附属医院    | 3 549  | 11.8        |
| 16 | 复旦大学附属华山医院      | 3 437  | -11.0       |
| 17 | 中南大学湘雅医院        | 3 412  | -14.4       |
| 18 | 中南大学湘雅二医院       | 3 379  | -6.6        |
| 19 | 北京大学第三医院        | 3 366  | 4.5         |
| 20 | 第二军医大学长征医院      | 3 359  | -0.6        |