

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.002

脾加骨髓细胞移植治疗小鼠大肠癌的实验研究*

侯国伟 刘晓菲 张哲男 赵志威 王宁 姜涛 朴大勋[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨半相合脾加骨髓细胞移植治疗小鼠大肠癌的效果及其对嵌合体水平和移植物抗宿主病(GVHD)的影响。**方法:**以接种 CT26 大肠癌细胞的 BALB/c× C57BL/6 杂交 F1 代雌性小鼠为受鼠,以健康雌性 F1、雄性 C57BL/6、雄性 C3H 小鼠为 MHC 全相合、半相合、不相合供鼠,观察移植后的抑瘤情况;另设 5 只化疗联合半相合脾加骨髓细胞移植的小鼠为监测组,用来作嵌合体的分析,观察各组 GVHD 的情况。**结果:**经化疗预处理的脾加骨髓细胞移植组小鼠肿瘤明显缩小,与单纯化疗未进行移植组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);化疗联合半相合脾加骨髓细胞移植的小鼠于移植 3 周后达完全供者植入,于移植后第 10 天左右出现纳差、倦怠、步态不稳、脱毛、腹泻、体重明显下降等 GVHD 的症状。**结论:**化疗预处理联合脾加骨髓细胞移植能对 CT26 大肠癌细胞产生 GVT 效应,并伴随着 GVHD 及嵌合率的变化。

关键词:骨髓细胞移植;化疗;大肠癌;移植物抗宿主病;移植物抗肿瘤效应

中图分类号:Q95-3;R735.34 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3005-05

Experiment Research on the Spleen and Bone Marrow Cell Transplantation in the treatment of Colorectal Cancer in Mice*

HOU Guo-wei, LIU Xiao-fei, ZHANG Zhe-nan, ZHAO Zhi-wei, WANG Ning, JIANG Tao, PIAO Da-xun[△]

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the anti-tumor effects and the effect condition of the chimera level and GVHD of transplanting MHC half-matched bone marrow cells combined with spleen cells in a murine model bearing colorectal cancer. **Methods:** Female (BALB/exC57BL/6)F1 mice (CB6F1, H-2Kb/d) were subcutaneously inoculated with CT26 cells to develop a solid tumor model. The syngenic, half-matched, and mismatched donor bone marrow cells were from healthy female F1, male C57BL/6 (H-2Kb), and male C3H (H-2K) mice, respectively. The tumor weights were measured after transplantation. Meanwhile, the testing-group which received chemotherapy, transplanting MHC half-matched bone marrow cells combined with spleen cells was used to analyze the chimera level. And GVHD were observed after the transplantation. **Results:** The tumor weights of mice undergone chemotherapy pretreatment, bone marrow cells combined with spleen cells were significantly decreased compared with those of the mice receiving chemotherapy alone ($P < 0.05$). The mice which received chemotherapy, transplanting MHC half-matched bone marrow cells combined with spleen cells attained donor implanted completely in 3 weeks after transplantation. Then began to fall ill at 10 days post-transplantation, GVHD symptoms including decreased appetite, tired, instability of gait, unhairing, lose weight, diarrhea. **Conclusion:** Transplantation of chemotherapy preprocess, MHC bone marrow cells combined with spleen cells could induce GVT effect in mice bearing CT26 tumor, which accompanied with the change of GVHD and chimerism.

Key words: Bone marrow transplantation; Chemotherapy; Colorectal cancer; Graft-versus-host disease(GVHD); Graft-versus-tumor effect(GVT)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R735.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3005-05

前言

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内,其发病率仅次于肺癌和乳腺癌,居第三位^[1]。近年来,免疫治疗在恶性血液系统疾病及实体瘤中均取得了很大的进步,随着非清髓异基因造血干细胞移植(non-myeloabla-

tive allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, NSCT)及移植后供者淋巴细胞输注(donor lymphocyte infusion, DLI)的开展,移植物抗肿瘤效应(graft-versus-tumor effect, GVT)被极大提高,同时移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的发生率显著降低,但如何更大限度的提高 GVT 效应并降低 GVHD 仍是目前的临床难题。近年来,有研究将 NSCT 用于大

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30972878)

作者简介:侯国伟(1986-),男,硕士研究生,研究方向:大肠癌的诊疗,电话:18249508713, E-mail:526221889@qq.com

[△]通讯作者:朴大勋, E-mail: piaodaxun@sina.com

(收稿日期:2013-08-21 接受日期:2013-09-19)

肠癌^[2]及卵巢癌^[3]的治疗,但因此类肿瘤对化疗较敏感,很难将治疗作用完全归功于 GVT 效应。本实验应用半相合小鼠,根据移植前不同预处理方案进行临床分组,旨在探讨 NSCT 对大肠癌实体瘤的抑制作用及其对嵌合体和 GVHD 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

供鼠:清洁级 C57BL/6 (H-2Kb), 雄性, 8~12 周龄, 体重 17~22g。受鼠:清洁级 CB6FI(BALB/c× C57BL/6 的杂交子一代, H-2Kdb), 雌性, 8~12 周龄, 体重 17~22g, 均购自(哈尔滨医科大学动物实验中心)。CT26 大肠癌细胞株 (Atcc 细胞库 CRL-2638) 购自上海复蒙基因生物科技有限公司。

1.2 主要仪器和试剂

流式细胞仪(美国 B.D 公司), PE-H-2Kb 和 FITC-H-2Kd 单抗(美国 B.D 公司), 环磷酰胺(CTX)注射剂(江苏恒瑞制药厂), RPMI 1640 培养液(美国 GIBCO 公司)。

1.3 受鼠实体瘤模型的建立

将 CT26 细胞培养 5d, 把细胞密度调整为 $1 \times 10^8/\text{ml}$, 抽取 0.3ml 注入 BALB/c 小鼠腹腔, 10 天后抽取腹水, 用生理盐水把肿瘤细胞悬液配制成 $1 \times 10^8/\text{ml}$, 0.3ml (3×10^7 个细胞)/只, 注射到 FI 小鼠腋下形成荷瘤鼠。

1.4 骨髓细胞和脾细胞的制备

将三种供鼠颈椎脱臼法处死, 在体积分数为 75% 的乙醇中浸泡 5 min, 无菌取小鼠的脾脏及股骨, 配制成脾和骨髓细胞悬液, 用 RPMI1640 培养液将脾细胞、骨髓细胞调成密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$, $2 \times 10^7/\text{ml}$, 将脾细胞及骨髓细胞等比例、等体积混合。

1.5 实验小鼠的处理方法

受鼠移植前 3 d 开始饮用含庆大霉素的饮用水, 至移植后两周, 在肿瘤细胞移植后第 4 天开始对荷瘤鼠进行腹腔注射, 荷瘤鼠分为无化疗组 and 化疗组。化疗组小鼠的处理方案为: 用生理盐水把环磷酰胺稀释成 150 mg/ (kg·d), 30 mg/ml 对化疗组小鼠进行腹腔注射。无化疗组小鼠的处理方案为: 单纯用生理盐水连续腹腔注射 3 d。在腹腔注射结束后第 4、6、8 天分别进行 3 次尾静脉注射, 每次注射含有脾、骨髓细胞各 2×10^7 、 1×10^7 的供鼠细胞 250 μL 。

1.6 实验小鼠的分组

a 组: 无化疗无移植; b 组: 无化疗单移植; c 组: 单化疗无移植; d 组: 化疗 + 全相合脾加骨髓细胞移植; e 组: 化疗 + 不相合脾加骨髓细胞移植; f 组: 化疗 + 半相合脾加骨髓细胞移植; 每组 5 只小鼠。另设 5 只与 f 组处理相同的小鼠为监测组, 用于嵌合体的检测。

1.7 观察指标

移植后观察受鼠的身体情况, 如饮食、大小便、纳差、步态不稳、体重下降、脱毛、弓背、倦怠等 GVHD 症状, 从而判断其 GVHD 情况, 并定期称量小鼠的体重。

1.8 瘤重和抑瘤率

当 c-f 组开始出现小鼠死亡时, 处死除检测组外的全部小鼠, 并剥取肿瘤称其重量。瘤重与抑瘤率的比较: 将 c 组小鼠作为对照组, 抑瘤率的计算方式为: (c 组瘤重 - 其他组瘤重)/c 组瘤重 $\times 100\%$ 。a、b 组小鼠不列入比较(因未进行化疗预处理)。

1.9 嵌合体分析

用流式细胞术检测嵌合体情况。在移植后 7、14、21 天, 应用流式细胞术分析方法, 用 PE-H-2K^b 及 FITC-H-2K^d 单克隆抗体, 通过流式细胞仪检测 MHC 表型。

1.10 GVHD 病理学观察

移植后第 21 天, 分别取 f 组小鼠的小肠、肝脏组织, 经甲醛固定、石蜡包埋、切片后 HE 染色, 进行病理学观察。

1.11 统计学分析

实验所得数据采用 SPSS19.0 软件处理, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用单因素方差分析及 t 检验, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 GVHD 及肿瘤的生长状况

a 组和 b 组小鼠在 CT26 大肠癌细胞接种后第 6、7 天见腋下肿块长出, 第 16 天小鼠开始出现死亡, 两组生存时间和肿瘤大小无显著差别 ($P > 0.05$); c-f 组小鼠于接种 CT26 第 14 天腋下才有包块出现, f 组小鼠的肿瘤生长相对缓慢, 在移植后第 12 天左右开始出现纳差、步态不稳、体重下降、脱毛、弓背、倦怠等 GVHD 症状; a、b 组小鼠到死亡前及 c、d、e 组小鼠处死前均进食正常、活泼好动、没有出现纳差、脱毛、体重下降等临床表现。

体重变化: c 组小鼠因单纯化疗未进行移植, 未出现 GVHD, 体重逐渐增加; d 组小鼠因输注全相合细胞, 未出现 GVHD, 体重逐渐增加; e 组小鼠因输注不相合细胞, 未出现明显 GVHD, 体重增长未受其明显影响, 体重逐渐增加; f 组小鼠因输注半相合细胞, 出现了明显 GVHD, 体重增长受到明显限制, 表明体重增长速度与 GVHD 呈负相关(图 1)。

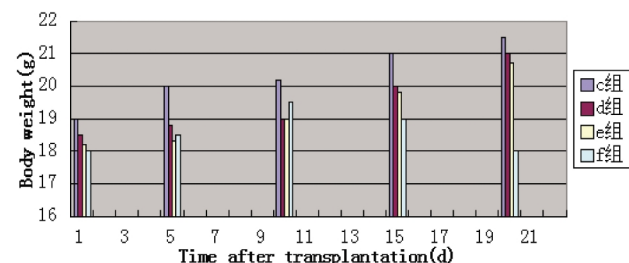


图 1 移植后各组小鼠的体重变化

Fig. 1 Changes of body weight after transplantation of mice from different groups

2.2 各组的瘤重及抑瘤率

脾和骨髓细胞移植后第 21 天时, f 组 1 只小鼠死亡, 此时处死全部小鼠(除检测组小鼠), 各组瘤重和抑瘤率结果如表 1, f 组小鼠的肿瘤重量明显低于 c 组, 差异具有明显的统计学意义。

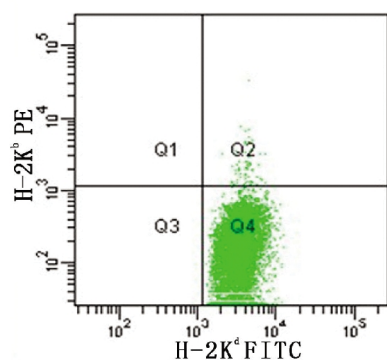
义($P < 0.05$), d 组小鼠瘤重微低于 c 组, e 组小鼠的瘤重轻度低于 c 组。f 组的抑瘤率高于 d 组和 e 组。

表 1 不同小组的小鼠瘤重和抑瘤率($\bar{x} \pm s$)

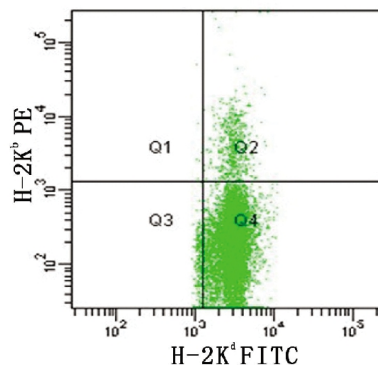
Table 1 Tumor weight and tumor inhibition rate in different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	N	Tumor weights(G)	Inhibition rate(%)
c 组	5	3.28 $\pm$ 0.52	---
d 组	5	3.01 $\pm$ 0.49	28.73
e 组	5	2.75 $\pm$ 0.35	35.45
F 组	5	2.20 $\pm$ 0.28*	54.56

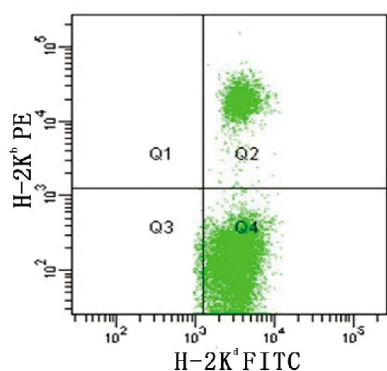
Note: * $P < 0.05$ vs Group c



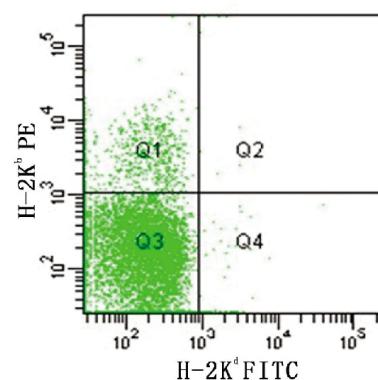
A



B



C



D

图 2 小鼠移植前后脾细胞 MHC 分子的表达

Fig. 2 Expression of MHC molecule on spleen after transplantation

A: 正常 F1 B: 移植后 7 天 C: 移植后 14 天 D: 移植后 21 天

A: Normal F1 B: after 7 days C: after 14 days D: after 21 days

2.4 病理学观察

移植后 21 天, 病理观察结果显示: f 组小鼠的小肠、肝脏组织结构破坏逐渐加重, 炎性细胞浸润逐渐增多, 符合 GVHD 病理改变。图 3 为小肠(A、B)、肝脏(C、D)的病理改变。

3 讨论

肿瘤的免疫治疗是当今国内外研究的热点, allo-HSCT (异基因造血干细胞移植) 是一种有效治疗恶性肿瘤及非恶性疾病的方法, 近年来成为治疗某些恶性血液性肿瘤疾病的主要手段之一, 明显提高了患者的长期生存率^[4]。但 GVHD 仍然是其最

2.3 嵌合体分析

研究结果显示, 检测组小鼠脾细胞 MHC 表型的变化为: 正常的 F1 小鼠脾细胞以 H-2K^b 和 H-2K^d 双阳性(H-2K^{db})为主, H-2K^b 单阳性极少; 移植后 7d, H-2K^{db} 双阳性细胞有所减少, H-2K^b 单阳性细胞有所增多; 移植后 14d, H-2K^{db} 双阳性细胞继续减少, H-2K^b 单阳性细胞继续增加; 移植后 21d, H-2K^{db} 双阳性细胞更少, 多数细胞呈 H-2K^b 单阳性, 提示移植后受者细胞(H-2K^{db} 双阳性)被供鼠细胞(H-2K^b 单阳性)逐渐取代(图 2)。

主要的并发症, 是影响患者生存质量和移植相关死亡的重要原因。因此, 如何在增强 GVT 的同时减少或避免 GVHD 的发生已成为时下研究的热点^[5]。随着研究的不断深入, 低剂量、低毒性的 NSCT, 因拓宽了移植适应症, 且降低了 TRM(移植相关死亡率), 具有很好的应用前景^[6]。另外, 由于供者造血干细胞的植入, 在受者体内形成一种混合嵌和状态, 为后续的 DLI 设置了平台^[7]。DLI 作为一种有效的过继性免疫疗法可以诱导移植后混合嵌合体转变为完全供者嵌合体, 加强 GVT 效应, 临床上常被用来预防与治疗移植后疾病复发^[8]。

本研究结果显示, 先经化疗预处理, 再输注 MHC 半相合

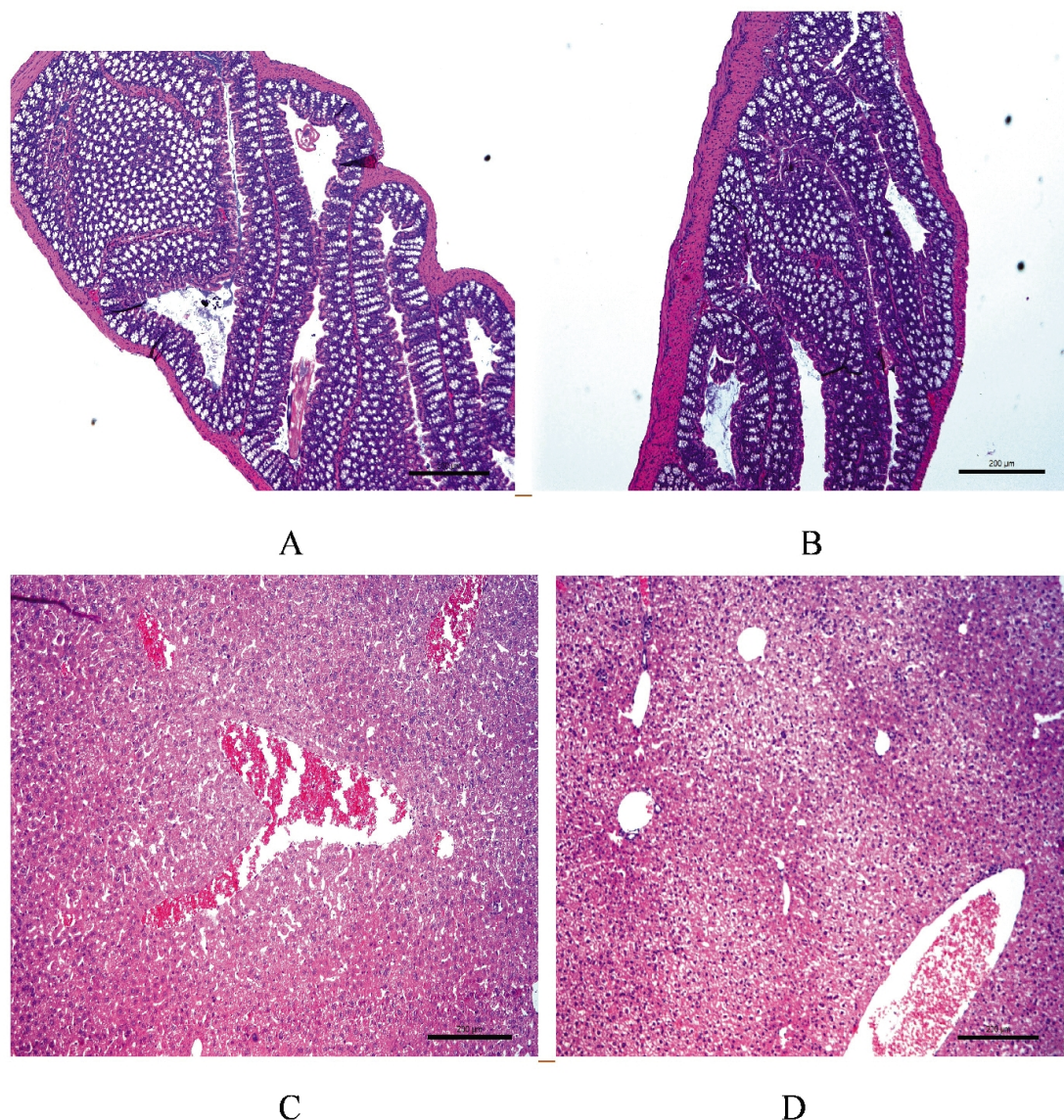


图 3 移植 21 天后 f 组小鼠小肠(A,B)、肝脏(C,D)(HE-染色, × 100 倍)

Fig. 3 Pathologic examination of mice from group d 21 days after transplantation (H-E, × 100)

A-B : small intestine C-D: liver

细胞的小鼠瘤重较其它组明显降低,且抑瘤率明显增加,与单纯化疗相比,差异具有统计学意义。移植 21d 后,大部分细胞呈 H-2K^b 单阳性, H-2K^d 双阳性细胞减少,与正常 F1 脾细胞相比,差异具有明显的统计学意义,表明随着植入时间的延长,供者细胞在受体内的数量不断增加。此外,化疗预处理联合输注 MHC 半相合细胞的小鼠 GVHD 症状逐渐加重,其肝、脾、小肠、皮肤组织结构破坏、炎性细胞浸润逐渐加重。潘耀柱等^[9]的研究表明,供者所占比例越高,其 GVT 效应越大,其复发的可能性越小,其 GVHD 的发生率及程度可能越大。

为了使供鼠细胞成功植入受体,避免产生 GVHD,需对受鼠进行化疗等清髓或非清髓预处理。为了减少移植相关并发症及死亡率,人们尝试降低预处理强度进行“非清髓”预处理。本实验应用小剂量的环磷酰胺进行非清髓预处理,使 MHC 半相合小鼠供者细胞能够成功植入,在不完全破坏受者免疫系统的

同时产生了明显的 GVT 效应,虽然后期产生了严重的 GVHD,但抑瘤效果仍较明显。有研究报道,合理的降低预处理的强度可以减少 GVHD 的发生^[10-13]。国内外一些抗实体瘤动物实验中 CTX 的用量通常大于本研究的剂量^[14-17],虽然使受者的免疫系统得到充分抑制,促进了供者细胞的成功植入,降低了移植相关并发症,但 GVT 效应也受到了明显抑制。因此,降低预处理强度可更好地发挥 GVT 效应,虽产生了相应的 GVHD,但可以通过检测嵌合体水平来进行后续的 DLI 及应用免疫抑制剂来进行治疗。Bishop 等^[18]将氟达拉滨和环磷酰胺作预处理治疗了 16 例转移性乳腺癌患者,其中 8 例患者达到缓解,中位生存期及无疾病进展期分别为 11 个月和 3 个月。Bay 等^[19]对 5 例卵巢癌患者进行了非清髓性异基因造血干细胞移植,其中 2 例接受了 DLI,结果显示肿瘤有效抑制率达 50% 以上,4 例患者发生了不同程度的 GVHD,接受 DLI 的患者能更长时间维持病情

的稳定性。Rini 等^[20]采用氟达拉滨加环磷酰胺预处理治疗的 12 例肾癌患者,4 例出现部分反应,应答率为 33%,GVT 效应出现在移植后 6 个月且供者完全嵌合状态。

总之,经化疗预处理的脾加骨髓细胞移植对半相合小鼠大肠癌实体瘤可产生 GVT 效应,并伴随相应的 GVHD。如何最大限度的提高 GVT 效应而降低 GVHD 仍然是我们所面临的挑战,今后的实验可以在调整非清髓预处理的剂量及移植后通过检测嵌合体水平来为后续的 DLI 及免疫抑制剂的使用方面进行进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96
- [2] Carnevale-Schianca F, Cignetti A, Capaldi A, et al. Allogeneic nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation in metastatic colon cancer: tumor-specific T cells directed to a tumor-associated antigen are generated in vivo during GVHD [J]. Blood, 2006, 107(9): 3795-3803
- [3] Bay JO, Fleury J, Choufi B, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in ovarian carcinoma: results of five patients [J]. Bone Marrow Transplant, 2002, 30(2): 95-102
- [4] Sureda A, Schmitz N. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in lymphoid malignancies [J]. Ann-Hematol, 2003, 82(1): 1-13
- [5] Sprangers B, Van Wijmeersch B, Fevery S, et al. Experimental and clinical approaches for optimization of the graft-versus-leukemia effect[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2007, 4(7): 404-414
- [6] Liang PK and Chao NJ. Non-myeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Using Mismatched / Haploidentical Donors: A review[J]. Blood Cells Mol Dis, 2008, 40(1): 20-24
- [7] Deol A, Luml G. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited [J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(7): 528-538
- [8] Kamimura T, Miyamoto T, Kawano N, et al. Successful treatment by donor lymphocyte infusion of adult T-cell leukemia / lymphoma relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Int J Hematol, 2012, 95(6): 725-730
- [9] 潘耀柱, 欧英贤, 白海, 等. 混合嵌合体与 GVHD、GVT 的临床研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(10): 119-123
Pan Yao-zhu, Ou Ying-xian, Bai Hai, et al. Clinical research of mixochimaera and GVHD, GVT [J]. China Journal of Modern Medicine, 2003, 13(10): 119-123
- [10] Costa LJ, Kumar S, Dispenzieri A, et al. Factors associated with favor-able outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma [J]. Leuk Lymphoma, 2009, 50 (5): 781-787
- [11] Roddie C, Peggs KS. Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(4): 473-487
- [12] Bashir Q, Khan H, Orlowski RZ, et al. Predictors of prolonged survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma[J]. Am J Hematol, 2012, 87(3): 272 -276
- [13] Efebera YA, Qureshi SR, Cole SM, et al. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed multiple myeloma [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(8): 1122-1129
- [14] 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
- [15] Azoulay-Dupuis E, Bedos JP, Mohler J, et al. Efficacy of Bal5788, a prodrug of cephalosporin bal9141, in a mouse model of acute pneumococcal pneumonia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1105-1111
- [16] Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, et al. Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model[J]. Cancer Res, 2003, 63(23): 8408-8413
- [17] Demirel T, Barkholt L, Blaise D. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells: an emerging treatment modality for solid tumors[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2008, 5(5): 256-267
- [18] Bishop MR. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2003, 4(1): 39-45
- [19] Bay J O, Fleury J, Choufi B, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in ovarian carcinoma: results of five patients[J]. Bone Marrow Transplant, 2002, 30(2): 95-102
- [20] Rini BI, Zimmerman T, Stadler WM, et al. Allogeneic stem-cell transplantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment and clinical results [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(8): 2017-2024