

免疫细胞治疗产品扩增活化的淋巴细胞的成瘤性研究

黄 瑛¹, 高 阳¹, 霍 艳^{1*}, 郭晓凯², 周英男², 王 歛², 汪巨峰¹, 李 波¹

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心、药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 北京永泰生物制品有限公司, 北京 101111

摘要: **目的** 研究免疫细胞治疗产品扩增活化的淋巴细胞(EAL)是否具有成瘤性, 为其临床应用提供安全性依据。**方法** 采用BALB/c裸鼠, 分为溶媒对照组、阳性对照(Hela细胞)组、EAL低、高剂量(1×10^7 、 5×10^7 /只)组, sc给药1次, 观察裸鼠临床症状、注射部位有无结节或肿物形成; 每周2次称动物体质量; 测量肿物体积, 绘制生长曲线; 肿物组织取出后, HE染色, 光镜下进行病理检查。**结果** 注射后1周内, 阳性对照组注射部位均有肿物生长, 随着时间的延长体积逐渐增大; 自给药后20 d起, 阳性对照组雌性裸鼠与溶媒对照组比较, 体质量显著增加($P < 0.05$ 、 0.01), 但身体明显消瘦; 病理学检查发现, 阳性对照组皮下肿瘤细胞灶状/巢状/团块状增生, 肿瘤组织坏死伴炎性细胞浸润、伴或不伴有真皮炎性细胞浸润及出血。EAL低、高剂量组临床症状观察和组织病理学检测均未见肿瘤样病变, 体质量增长趋势与溶媒对照组一致。**结论** BALB/c裸鼠sc EAL不具有成瘤性。

关键词: 免疫细胞治疗; 扩增活化的淋巴细胞(EAL); 成瘤性; Balb/c裸鼠; 安全性

中图分类号: R994

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)02-0230-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.010

Tumorigenicity of immunocyte therapy product expanded activated lymphocytes in Balb/c nude mice

HUANG Ying¹, GAO Yang¹, HUO Yan¹, GUO Xiaokai², ZHOU Yingnan², WANG Yu², WANG Jufeng¹, LI Bo¹

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control; The Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China

2. Immunotech Applied Science Limited, Beijing 101111

Abstract: Objective To study the tumorigenicity of expanded activated lymphocytes (EAL) from immunocyte therapy products and to provide safety data for its clinical application. **Methods** Total of 80 BALB/c nude mice were divided into four groups: negative control, positive control (Hela cells), EAL low-dose and high-dose group (1×10^7 and 5×10^7 cells per mouse). Cells were injected subcutaneously once to observe the clinical symptoms of the formation of nodules or masses in the injection site of nude mice. Animal weight was weighed two times a week; The volume of tumors was measured to plot growth curve. It would be confirmed whether the cancer or metastatic tumor form through the pathological examination after HE staining. **Results** The Hela cell tumor-bearing mice was constructed successfully, and the tumor formation in the positive mice group was 100%. Within one week after injection, there were masses growth in the injection site of positive control group and the volume increased gradually along with the time. Body mass of female nude mice in positive control group increased significantly compared with negative control group ($P < 0.05$, 0.01) 20 d after administration, but the body was much thinner. Histopathological examination revealed that the positive control group contained subcutaneous tumor cells with foci/nests/lumps like hyperplasia, tumor necrosis accompanied by infiltration of inflammatory cells, with or without infiltration and hemorrhage of true dermatitis cells. However, neither the EAL low-dose group nor the EAL high-dose group showed tumor-like lesions in the clinical observation and histopathology, and the

收稿日期: 2017-10-30

基金项目: 十二五国家科技重大专项(2015ZX09501007-004); 国家重点研发计划课题(2016YFA0101503); 中检院学科带头人课题(2015X1); 广东省省级科技计划项目(2014B020227002)

第一作者: 黄 瑛(1983—), 女(壮族), 广西, 助理研究员, 博士, 主要从事药物临床前安全性评价。Tel: (010)67876252 E-mail: huangying1002@nifdc.org.cn

*通信作者: 霍 艳, 女, 研究员, 主要从事药物临床前安全性评价。Tel: (010)67872233-8001 E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

growth trend of body mass was consistent with that of negative control group. **Conclusion** The immunocyte therapy product EAL appears to be safe and without tumorigenicity in BALB/c nude mice.

Key words: immunocyte therapy; expanded activated lymphocytes (EAL); tumorigenicity; BALB/c nude mice; safety

扩增活化的淋巴细胞 (expanded activated lymphocytes, EAL), 是治疗肿瘤和慢性病毒性感染的细胞免疫疗法之一。其技术是从供者外周血 (20~100 mL) 中分离单个核细胞, 经体外扩增活化培养, 获得大量在生理条件下能杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞的免疫细胞群, 主要成分为 $CD3^+$ $CD8^+$ 杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL, 约 70%) 和自然杀伤细胞 (NK, 约 10%)。EAL 作为细胞过继性免疫治疗, 经过一次或多次回输, 可有效辅助恶性实体瘤、非实体瘤以及慢性病毒性感染的治疗^[1-3]。

尽管 EAL 具有广泛的临床应用前景, 但 EAL 回输在临床应用中的长期安全性问题有待深入探索, 且 EAL 作为一类具有生物学效应的细胞, 存在较大的成瘤风险, 因此对 EAL 的成瘤性研究非常重要。本研究 EAL 的移植对裸鼠是否具有成瘤性, 从而为 EAL 安全性考察提供参考。

1 材料

1.1 供试品和阳性对照品

人源 EAL, 浓度 5×10^7 、 2.5×10^8 /mL, 乳白色液体; EAL 溶媒, 生理盐水加 1% 人白蛋白, 为无色透明液体; 均 4~25 °C 保存, 给药当天制备且在制备完成后的 12 h 内完成给药, 由北京永泰免疫应用科技有限公司提供。

HeLa 细胞, 浓度 1×10^7 /mL, 乳白色液体, 4~25 °C 保存, 给药当天制备且在制备完成后的 12 h 内完成给药, 由中国食品药品检定研究院提供。

1.2 主要仪器

LEICA ASP300 型脱水机、SAKURAIVS-410 型切片机、SAKURA Tissue-TekDRS-2000 型全自动染色机、SAKURATecc4714 型包埋机、SAKURA Tissue - Tek GLAS C410 型封片机, 均购自日本樱花; 生物显微镜, OLYMPUS BX51, 日本奥林巴斯。

1.3 实验动物

BALB/c 裸鼠, 雌雄各半, SPF 级, 约 5 周龄, 体重 13~18 g, 由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2009-0017。实验动物 5 只/笼, 剩余动物 4 只/性别/笼, 自由摄食、饮水。动物饲养于 SPF 屏障系统, 饲养室 12 h 照明, 温度 20~26 °C, 日温差 ≤ 3 °C,

相对湿度 40~70%。笼具采用 PC 聚碳酸酯鼠盒 CP-5 型 (294 mm×190 mm×125 mm), 底铺高压蒸汽灭菌的玉米芯垫料, 每周 1 次更换、清洗及消毒笼具。

2 方法

2.1 实验设计

采用 80 只 BALB/c 裸鼠, 雌雄各半, 分为 4 组: 溶媒对照 (EAL 溶媒) 组、阳性对照组 (HeLa 细胞, 2×10^6 /只)、EAL 低、高剂量 (人源 EAL, 1×10^7 、 5×10^7 /只) 组。于各组动物左侧腋下部位 sc 1 次相应的供试品, 给药体积为每只 0.2 mL。分别在第 3 周和 3 个月对每组半数动物进行病理检查, 剖检接种部位, 有肿物形成的称质量。观察各淋巴结和各器官有无结节形成, 对可疑结节和肿物进行病理组织检查, 判断是否有肿瘤和转移瘤形成。

2.2 临床症状观察

每天上下午对全部动物进行常规临床症状观察, 以及观察并触摸注射部位有无结节或可疑肿物形成, 且形成的任何结节或肿物均应进行记录, 直至实验结束。

2.3 结节或肿物体积测定

给药后定期 (约每周 2 次, 解剖前后每周 1 次) 测定动物发生的结节或肿物。测定时, 使用游标卡尺进行双向测量肿物长径 (a) 和短径 (b), 计算肿物体积, 肿物体积 = $1/6\pi ab^2$ 。待实验结束后, 绘制肿物生长曲线。对结节或肿物大小超过 4 500 mm³ 的动物在预定解剖时间前进行安乐死并剖检。

2.4 体质量测定

给药后定期 (约每周 2 次) 使用电子天平对所有动物进行体质量测定。

2.5 病理学检查

对于全部预定解剖的动物和各组濒临死亡动物, ip 0.45% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 麻醉, 从腹腔后大静脉完全放血处死。进行解剖, 肿物取出后双向测量并计算肿物体积, 作为其生长曲线最后一个时间点。

10% 中性缓冲福尔马林溶液固定肿物组织, 经修块取材, 逐级酒精脱水, 石蜡包埋, 滑动切片机

切片(厚约 3 μm),经苏木精-伊红(HE)染色,光镜下进行病理检查。

2.6 数据的统计与处理

对于体质量数据按照以下方法统计:(1)首先用 Bartlett 检验方法进行数据均一性检验,如果数据均一($P>0.05$),则进行方差分析检验(F 检验);如果 Bartlett 检验的结果显著($P\leq 0.05$),则进行 Kruskal-wallis 检验。(2)如果方差分析检验结果显著($P\leq 0.05$),则进一步用 Dunett 参数检验法进行多重比较检验;如果方差分析结果不显著($P>0.05$),则统计结束。(3)如果 Kruskal-wallis 检验结果显著($P\leq 0.05$),则进一步用 Dunett 非参数检验法进行多重比较检验;如果 Kruskal-wallis 检验结果不显著($P>0.05$),则统计结束。

3 结果

3.1 临床症状观察结果

阳性对照组所有动物给药后第4天开始,注射部位全部有小结节/肿物生长,并随着时间的延长结

节体积逐渐变大。给药后4周有少数阳性对照组小鼠瘤体发生溃烂,阳性对照组的半数动物在给药第7周因肿物大小超过预期规定范围紧急剖检。

溶媒对照组和EAL组动物未见结节/肿物发生。

3.2 结节或肿物体积测定结果

阳性对照组动物给药后1周内注射部位全部有小结节/肿物生长,并随着时间的延长结节体积逐渐变大,肿物生长曲线见图1。

3.3 体质量测定结果

实验期间,各组动物体质量总体呈增长趋势。自给药后20d起,阳性对照组雌性裸鼠与溶媒对照组比较,体质量显著增加,显著具有统计学差异($P<0.05$ 、 0.01),分析由于肿物在第20天左右开始迅速增长,造成该组动物体质量增长迅速。而实际观察中,阳性对照组小鼠身体明显消瘦,这也符合移植瘤小鼠模型的特点。EAL组小鼠体质量始终保持与溶媒对照组呈相同的生长趋势,未见统计学差异。结果见图2。

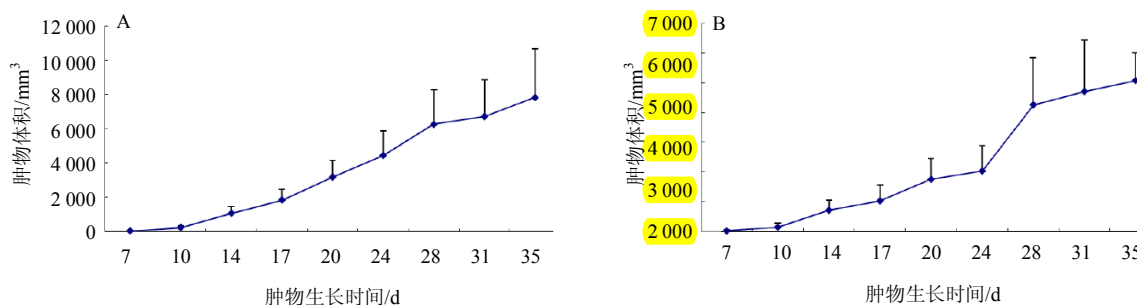


图1 阳性对照组雌(A)、雄(B)裸鼠肿物生长曲线

Fig. 1 Masses growth curve of female (A) and male (B) nude mice in positive control group

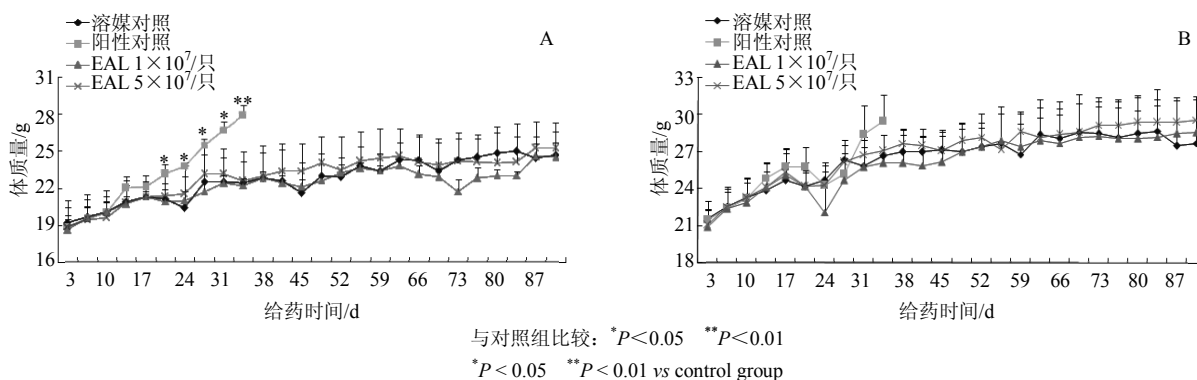


图2 雌(A)、雄(B)裸鼠体质量变化曲线

Fig. 2 Body mass changes curve of female (A) and male (B) nude mice

3.4 病理学检查结果

所有组别的半数动物在给药第3周计划剖检;阳性对照组的另外半数动物在给药第7周因肿物大

小超过方案规定范围紧急剖检;溶媒对照、EAL组的另外半数动物在给药3个月进行了计划剖检;阳性对照组接种部位可见肿物;组织病理学检查发现,

皮下肿瘤细胞灶状/巢状/团块状增生,肿瘤组织坏死伴炎性细胞浸润、伴或不伴有真皮炎性细胞浸润及出血(图3)。EAL组与溶媒对照组未见相关的肿瘤病变。

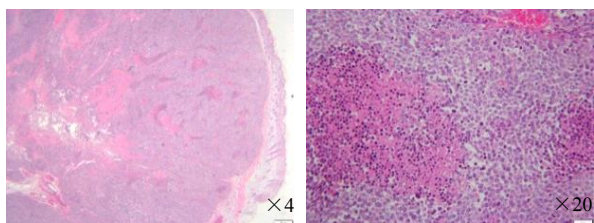


图3 阳性对照组肿瘤 HE 染色结果

Fig. 3 Hematoxylin-eosin staining of tumor after injection in positive nude mice

4 讨论

相比传统的化学药物以及一般生物制品,细胞治疗产品存在较大的成瘤性风险,需进行成瘤性研究^[4-5]。本实验采用BALB/c裸鼠对免疫细胞治疗产品EAL的成瘤性进行研究,为保证实验数据真实可靠,所有研究均在GLP条件下进行。

BALB/c裸鼠是一种11号染色体上隐性裸基因(nu)发生突变的小鼠,其表皮无毛,胸腺先天性缺陷,T淋巴细胞缺损,缺乏免疫应答性,异体或异种组织容易在其身上移植成功而不发生排斥反应,是本研究理想的动物模型^[6-10]。药典成瘤实验要求,阳性对照组使用HeLa细胞剂量为 2×10^6 /只小鼠,同时参照文献报道^[11-13]和前期预实验结果,设定阳性对照剂量为 2×10^6 /只;供试品最低剂量为 1×10^7 /只,同时设计5倍剂量考察在高浓度下的成瘤性。

药典中关于成瘤性实验要求,各实验组动物数不少于10只,阳性对照组应至少9只有进行性肿瘤生长时,实验视为有效。相较背部或臀部,腋下部位血液循环更丰富,有利于肿瘤的生长,皮下移植瘤部位选择腋下部位最佳^[14]。在本研究中,选择裸鼠左侧腋下部位sc的方式,阳性对照组雌雄共20只动物给药后全部有进行性肿瘤生长,肿瘤发生率为100%,成功建立BALB/c裸鼠皮下移植瘤模型。

剖检后通过组织病理学检查发现,所有阳性对照组动物注射部位肿瘤镜检可见皮下肿瘤细胞灶状/巢状/团块状增生、肿瘤组织发生坏死,病变程度分别为重度和中度;超过半数阳性对照组动物发生真皮炎性细胞浸润,病变程度极轻度至轻度;阳性对照组接种部位的病变未见恢复。溶媒对照组、EAL

低、高剂量组未见肿瘤样病变,表明sc EAL对BALB/c裸鼠不具有成瘤性。

参考文献

- [1] Yu R, Yang B, Chi X, et al. Efficacy of cytokine-induced killer cell infusion as an adjuvant immunotherapy for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 851-864.
- [2] Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity [J]. J Transl Med, 2013, 11: 83.
- [3] Introna M, Golay J, Rambaldi A. Cytokine Induced Killer (CIK) cells for the treatment of haematological neoplasms [J]. Immunol Lett, 2013, 155(1-2): 27-30.
- [4] Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(2): 189-192.
- [5] Gu E, Chen W Y, Gu J, et al. Molecular imaging of stem cells: tracking survival, biodistribution, tumorigenicity, and immunogenicity [J]. Theranostics, 2012, 2(4): 335-345.
- [6] 聂德志, 宛莹, 贲亮, 等. Balb/c裸鼠体内的干细胞致瘤实验 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(6): 888-893.
- [7] 李妍, 李飞飞, 林蓓, 等. $\alpha 1,2$ -岩藻糖转移酶基因转染对卵巢癌细胞RMG-I裸鼠体内致瘤性及血管生成因子表达的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(7): 505-517.
- [8] 黄金棋, 林艳娟. 间充质干细胞治疗自身免疫性疾病及其细胞生物治疗的致瘤性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45): 8478-8482.
- [9] 秦秀军, 张伟, 李建国, 等. 人脂肪间充质干细胞的致瘤性研究 [J]. 天津医药, 2013, 41(2): 152-154.
- [10] 尹晶晶, 魏锦萍, 许超琪, 等. 神经干细胞对裸鼠的致瘤性实验研究 [J]. 中国药物与临床, 2012, 12(6): 730-731.
- [11] 白彦东, 李永梅, 田学忠, 等. 永生化骨髓间充质干细胞克隆形成能力和致瘤性的实验研究 [J]. 山东医药, 2010, 50(3): 46-47.
- [12] 王鸣刚, 黄小娟, 张虹, 等. CTX免疫抑制小鼠替代裸鼠用于成瘤实验的研究 [J]. 生物技术, 2014(1): 75-80.
- [13] 周媛媛. 青蒿琥酯对宫颈癌HeLa和SiHa细胞裸鼠移植瘤放射增敏的实验研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011.
- [14] 周斌, 花亚伟, 盛书娟, 等. 胃肠道间质瘤细胞组织在不同周龄裸鼠不同部位的成瘤情况 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28): 5205-5209.