

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0310

论著

嵌合抗原受体 T 细胞与不同放疗方式协同治疗大肿块型淋巴瘤的研究

郭睿婷¹, 曹芯萍¹, 张祎¹, 赵一帆¹, 赵明峰², 肖霞²

(1. 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2. 天津市第一中心医院血液科, 天津 300192)

摘要 目的:探索不同放疗方式与嵌合抗原受体 T(CAR-T)细胞协同治疗大肿块型淋巴瘤的疗效。方法:建立大肿块型淋巴瘤异种移植小鼠模型,使用低、中、高剂量的 X 射线对小鼠进行照射,测量照射后各组小鼠肿瘤体积的变化情况。再将低、中、高剂量的 X 射线分别与 CAR-T 细胞联用对小鼠进行治疗,记录不同的联用方式治疗后肿瘤体积的变化情况和各组小鼠的生存时间,使用流式细胞术检测各组小鼠外周血和肿瘤内 CAR-T 细胞占比的差异,观察治疗后各组小鼠的不良反应。结果:单纯 X 射线治疗无法控制巨块型淋巴瘤小鼠的肿瘤进展,而分别将低、中、高剂量的 X 射线与 CAR-T 细胞联用则均能使小鼠的肿瘤体积缩小。与低剂量联合组相比,中、高剂量联合组小鼠的肿瘤体积缩小更显著且未见重新增大的迹象($F_{\text{组间}}=1\ 052.364$, $F_{\text{时间}}=14\ 861.095$, $F_{\text{交互}}=49.864$, 均 $P<0.001$;组间均 $P<0.05$),此外,中剂量联合组[$HR=21.880(3.884\sim124.600)$, $Log\text{-rank}\chi^2=12.090$, $P<0.01$]和高剂量联合组[$HR=21.880(3.884\sim124.600)$, $Log\text{-rank}\chi^2=12.090$, $P<0.01$]小鼠生存期也均明显延长。中、高剂量 X 射线可能更利于 CAR-T 细胞的瘤内浸润,与低剂量联合组相比,中($t=28.200$, $P<0.05$)、高($t=23.960$, $P<0.05$)剂量联合组在治疗后第 14 天的瘤内 CAR-T 细胞比例均明显增加。不同联用方式的不良反应大多在可耐受范围内。结论:与低剂量 X 射线相比,中、高剂量 X 射线能与 CD19 CAR-T 细胞协同更有效地治疗大肿块型淋巴瘤。

关键词 淋巴瘤;淋巴瘤,B 细胞;放射疗法;免疫疗法,过继

中图分类号 R733.4

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0310-07

Chimeric antigen receptor T cells synergize with different radiotherapy modalities for the treatment of bulky lymphoma

GUO Ruiting¹, CAO Xiping¹, ZHANG Yi¹, ZHAO Yifan¹, ZHAO Mingfeng², XIAO Xia²

(1.The First Central Clinical School,Tianjin Medical University,Tianjin 300192,China; 2.Department of Hematology,Tianjin First Central Hospital,Tianjin 300192,China)

Abstract Objective: To explore the efficacy of different radiotherapy modalities in synergistic treatment of bulky lymphoma with chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells. **Methods:** The bulky lymphoma xenograft mice models were established, which were irradiated with low, medium and high doses of X-rays. The changes in the tumor volume of the mice in each group were measured after irradiation. After that, the low, medium and high doses of X-rays were combined with CAR-T cells to treat the mice, and the changes in tumor volume and the survival time of those mice in each group were recorded after different combination treatments. Flow cytometry was used to detect the differences in the percentage of CAR-T cells in the peripheral blood and tumors of the mice in each group, and the adverse reactions of the mice in each group were observed after treatment. **Results:** X-ray treatment alone was unable to control tumor progression in mice with bulky lymphoma, whereas combining low, medium, and high doses of X-rays with CAR-T cells, respectively, all resulted in a reduction in tumor size. Compared with the low-dose combination group, mice in the medium- and high-dose combination groups showed more significant reduction in tumor volume, which showed no signs of re-enlargement, either ($F_{\text{between groups}}=1\ 052.364$, $F_{\text{time}}=14\ 861.095$, $F_{\text{interaction}}=49.864$, all $P<0.001$; $P<0.05$ for all between groups). In addition, the survival period of mice in the medium-dose combination group [$HR=21.880(3.884\sim124.600)$, $Log\text{-rank}\chi^2=12.090$, $P<0.01$] and high-dose combination group [$HR=21.880(3.884\sim124.600)$, $Log\text{-rank}\chi^2=12.090$, $P<0.01$] were also significantly prolonged. Medium- and high-dose X-rays might be more favorable for intratumoral infiltration of CAR-T cells. The proportion of intratumoral CAR-T cells was significantly increased in both the medium($t=28.200$, $P<0.05$) and high($t=23.960$, $P<0.05$) dose combination groups on day 14 post-treatment compared to the low-dose combination group. Most of the adverse effects of the different combination modalities were within the tolerable range. **Conclusion:** Compared to low-dose X-rays, medium- and high-dose X-rays can synergize with CD19 CAR-T cell therapy to more effectively treat bulky lymphoma.

Key words lymphoma; lymphoma, B-cell; radiotherapy; immunotherapy, adoptive

基金项目 天津市卫生健康委员会科技项目 (ZC20074)

作者简介 郭睿婷(1998-),女,硕士在读,研究方向:血液系统恶性肿瘤的细胞免疫疗法;通信作者:肖霞,E-mail:xxiaao@126.com。

CD19 嵌合抗原受体 T(chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞疗法虽已成为治疗复发/难治型 B 细胞淋巴瘤的有效手段^[1], 但仍有部分患者预后不佳。有临床研究发现, 具有大块肿物特征(肿物直径 ≥ 7.5 cm^[2]) 是影响 CAR-T 细胞治疗淋巴瘤疗效的独立危险因素之一^[3-4], 目前亟待寻找能够突破此瓶颈的治疗策略。放疗法常用于伴有大块肿物的晚期淋巴瘤患者的姑息治疗^[5], 在多种实体肿瘤中, 其也已被证明可增强免疫疗法的疗效^[6]。Weiss 等^[7]研究发现, 放疗可在直接杀伤肿瘤细胞的同时, 改善局部肿瘤微环境, 从而利于 CAR-T 细胞进入实体瘤内部发挥杀伤作用。然而, 目前探索 CAR-T 细胞与放疗联用以治疗大肿块型淋巴瘤的研究尚少见。此外, 放疗剂量及相应分割方案的选择也是放疗与免疫疗法联合的难点。有研究指出, 与传统的放疗分割方式相比, 超剂量的放疗分割方式(即在总剂量相同或较低的情况下, 短时间内给予较大剂量) 能与免疫疗法产生更好的协同作用^[8]。本研究通过联合 CD19 CAR-T 细胞疗法与不同的放疗分割方式, 初步探索二者在大肿块型淋巴瘤中的最佳组合策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系与实验动物 SPF 级 4~6 周龄 BALB/c(裸鼠)雄鼠 80 只, 初始体重(23.22 \pm 0.95) g, 购自华阜康生物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(京)2014-004, 饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物实验室(伦理号 2023-SYDWLL-000256)。U-2932、Raji 淋巴瘤细胞株及 K-562 慢性髓系白血病细胞株均购自北纳微生物及细胞资源保藏中心(BNCC), 储存于-196℃的液氮中。

1.1.2 主要试剂与仪器 实验使用的 CD19 CAR 质粒购自美国 Creative Biolabs 公司。感受态细胞 DH-5 α 购自北京宝日医生物技术有限公司。注射用重组人白细胞介素-2 购自北京四环生物有限公司。磁珠分选试剂盒、磁力架及 LS 磁珠分选柱均购自德国美天旎生物技术有限公司。TIANGEN 无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。Lenti-Pac 慢病毒包装试剂盒购自广州复能基因有限公司。X-VIVO15 购自德国 Lonza 公司。RPMI1640、胎牛血清及青/链霉素均购自美国 Gibco 公司。PBS 购自美国 Hyclone 公司。DMSO 购自瑞士 Novartis 公司。Ficoll 分离液购自美国 Millipore 公司。CARTEST-19 检测试剂盒购自上海近岸科技有限公司。CFSE 购自美国 Invitrogen 公司。CD19 及

CD3 单克隆抗体均购自美国 BD 公司。超低温冰箱购自美国 Thermo 公司。多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司。流式细胞分析仪购自美国 Beckman 公司。台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。显微镜购自日本 Olympus 公司。X 线照射仪 Red Source RS2000 来自中国医学科学院放射医学研究所, 购自美国 Red Source 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CAR-T 细胞的制备及检测 CAR-T 细胞的制备方法参考本课题组前期研究^[9]。取健康志愿者(男, 28 岁, 已获知情同意)外周血标本后, 采用免疫磁珠法分选并富集 CD3⁺T 细胞, 在其充分扩增后进行慢病毒转染。

1.2.2 CFSE 法检测杀伤过程中肿瘤细胞数目变化 按照 CFSE 试剂说明书将储存液溶于 DMSO 中, 配置工作液, 取 1 mL 工作液对 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个肿瘤细胞进行染色, 使用流式细胞仪检测染色程度。待荧光肿瘤细胞占有所有细胞的 95% 以上时, 将肿瘤细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 分别与 CAR-T 细胞(CD19 CAR-T 组)和未转导的 T 细胞(Untransduced T cells, UTD-T 组)以 2:1 的效靶比进行共培养, 或分别用 2 Gy(2 Gy 组)、4 Gy(4 Gy 组)和 8 Gy(8 Gy 组)剂量的 X 射线进行单次照射。在与 CAR-T 或 UTD-T 共培养 6、12、24、48 h 后及 X 射线照射 12、24 h 后, 用流式细胞仪检测体系中荧光肿瘤细胞的数目, 计算 CAR-T 细胞或 X 射线对肿瘤细胞的杀伤率。实验重复 3 次。

1.2.3 大肿块型小鼠淋巴瘤模型的建立 大肿块型小鼠淋巴瘤模型的建立方法参考本课题组前期研究^[10], 在 37℃、5% CO₂、95% 湿度条件下, 先将用于造模的 Raji 肿瘤细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养, 每 1~2 d 根据细胞生长速度传代并更换 1 次培养液。造模前收集处于对数生长期的肿瘤细胞。将 5×10^6 个 Raji 细胞与 100 μ L Matrigel 胶混合, 注射于 BALB/c 裸鼠的腋窝皮下组织中, 每天观察小鼠的状态和成瘤情况, 小鼠最终成模率为 92.5%(74/80)。在肿瘤形成后用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积, 肿瘤体积=(肿瘤短径²×肿瘤长径)/2, 待小鼠肿瘤体积达 300~400 mm³ 时进行体内实验。

1.2.4 X 射线模拟放疗实验 采用随机数字表法将建模成功的异种移植淋巴瘤小鼠分为 4 组, 每组 6 只, 进行 X 射线模拟放疗实验。低剂量 X 射线照射组(低剂量组), 2 Gy×5 次, 1 次/d; 中剂量 X 射线照射组(中剂量组), 4 Gy×5 次, 1 次/d; 高剂量 X 射线

照射组(高剂量组),8 Gy×3次,1次/d;单纯肿瘤处理组(单肿瘤组),不进行照射。其中,低剂量组放疗设计模拟传统放疗方案,中、高剂量组模拟大分割放疗方案。照射条件为距皮100 mm,剂量率1 Gy/min,照射在中国医学科学院放射医学研究所进行。在照射后第1、3、7、14、21、28、35天时测量肿瘤体积。当肿瘤直径达2 cm时对小鼠进行安乐死。

1.2.5 X射线联合CAR-T细胞杀伤实验 采用随机数字表法将建模成功的异种移植淋巴瘤小鼠分为5组,每组10只。单纯CAR-T细胞治疗组(CAR-T组),将 5×10^6 个CAR-T细胞经尾静脉注射入小鼠体内。低、中、高剂量X射线照射联合CAR-T细胞治疗(分别为低、中、高剂量联合组),先行X射线模拟放疗,照射条件同1.2.4;放疗结束24 h后将 5×10^6 个CAR-T细胞经尾静脉注射入小鼠体内。单纯肿瘤处理组(单肿瘤组),不进行照射及CAR-T细胞治疗。在CAR-T细胞输注后第1、3、7、14、21和28天监测肿瘤体积。记录小鼠的总生存期,观察终点为第120天。当小鼠肿瘤直径达2 cm时对小鼠进行安乐死,记为死亡状态。

1.2.6 小鼠外周血和肿瘤组织样本的提取及检测 在CAR-T细胞输注后第3、7、14和21天,从单纯CAR-T细胞治疗组和低、中和高剂量联合组中各随机抽取6只小鼠,利用尾静脉取血法,获取外周静脉血样本。在CAR-T细胞输注后第14天,从单纯CAR-T细胞治疗组和低、中和高剂量联合组随机抽取3只小鼠处死,分离小鼠的肿瘤组织并将其研磨、过筛、清洗,获得原代肿瘤细胞。在外周血及肿瘤组织样本中加入溶血素,孵育10 min后,用PBS清洗3遍,分别加入5 μ L单克隆抗人CD3和CD19抗体,避光室温孵育15 min后,用生理盐水清洗抗体,重悬细胞上机行流式检测。

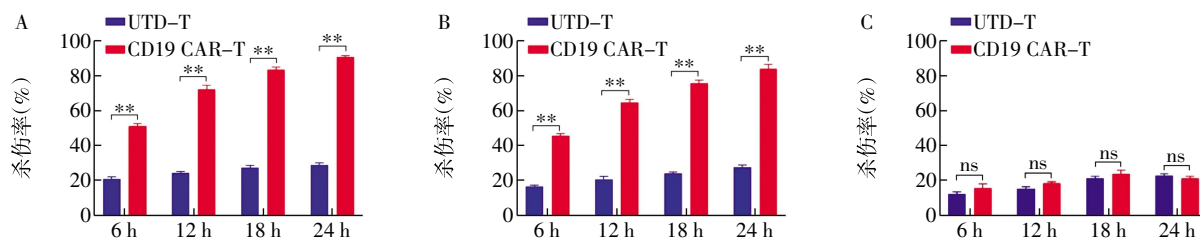
1.2.7 小鼠的不良反应及分级 小鼠的不良反应包括:被毛变化,姿态改变,活动方式改变,活动性

改变,个性改变,表情改变,过度出汗,过度分泌唾液,眼分泌物增加,鼻分泌物增加磨牙,不正常的发声,触及疼痛部位被迫转变姿态,动物被迫运动,舔、咬、抓或摇晃疼痛部位,排尿行为异常,排便行为异常,食欲不振饮食减少,饮水量减少,体重降低,脱水。将每个项目赋予分值(出现=1,未出现=0),总分为20分。根据评分将小鼠痛苦程度分为4级:0~4分为1级;5~9分为2级;10~14分为3级,小鼠感到明显疼痛或痛苦;15~20分为4级,小鼠难以忍受。

1.3 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行数据分析,GraphPadPrism9软件进行作图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间多重比较行 $LSD-t$ 检验;不符合正态分布的资料则采用中位数进行统计描述,采用非参数检验进行组间比较。对各项指标在不同时间的差异分析采用重复测量方差分析,不满足莫奇来球形度检验的数据采用Greenhouse检验进行校正或使用多元方差分析。采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验对生存曲线进行分析,小鼠的生存时间定义为小鼠死亡或当肿瘤直径达到2 cm时对小鼠处以安乐死的时间点。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD19 CAR-T细胞对淋巴瘤细胞株的杀伤情况 与UTD-T相比,CD19 CAR-T细胞对淋巴瘤细胞株U-2932和Raji细胞在共培养6、12、18和24 h后的杀伤效果更好[$F_{\text{组间}}(U-2932)=2\,274.146$, $F_{\text{时间}}(U-2932)=91.057$, $F_{\text{交互}}(U-2932)=40.148$, 均 $P < 0.001$; $F_{\text{组间}}(Raji)=1\,516.482$, $F_{\text{时间}}(Raji)=88.441$, $F_{\text{交互}}(Raji)=27.853$, 均 $P < 0.001$;在各时间点均 $P < 0.05$],对于不表达CD19的K-562细胞,两组间杀伤率的差异无统计学意义($F_{\text{组间}}=2.495$, $P=0.189$; $F_{\text{时间}}=14.582$, $P < 0.001$; $F_{\text{交互}}=1.187$, $P=0.356$;在各时间点均 $P > 0.05$),见图1。



注:CAR-T:CD19 嵌合抗原受体T;A:CD19 CAR-T细胞对U-2932细胞系的杀伤情况;B:CD19 CAR-T细胞对Raji细胞系的杀伤情况;C:CD19 CAR-T细胞对K-562细胞系的杀伤情况; ** $P < 0.01$

图1 CD19 CAR-T细胞和UTD-T对肿瘤细胞的杀伤情况(CFSE染色)

Fig.1 The cytotoxicity of tumor cell lines by CD19 CAR-T cells and UTD-T (CFSE staining)

2.2 不同剂量X射线对淋巴瘤细胞株的杀伤情况 与2 Gy相比,4 Gy和8 Gy剂量的X射线在照射后第12和24小时对U-2932和Raji淋巴瘤细胞株的杀伤率

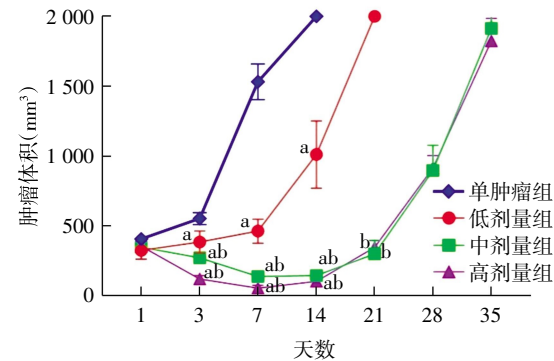
均显著升高(均 $P < 0.05$)。与4 Gy相比,8 Gy剂量的X射线在照射后第12和24小时对U-2932和Raji淋巴瘤细胞株的杀伤率显著升高(均 $P < 0.05$),见表1。

表 1 2、4 和 8 Gy X 射线对肿瘤细胞的杀伤情况($n=9, \bar{x} \pm s, \%$)
Tab.1 The cytotoxicity of tumor cells by 2 Gy, 4 Gy and 8 Gy doses of X-rays($n=9, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	U-2932		<i>t</i>	Raji		<i>t</i>
	12 h	24 h		12 h	24 h	
2 Gy	32.00±2.45	34.67±2.62	4.000	27.33±1.70	33.33±1.70	3.530*
4 Gy	48.33±2.05 ^a	52.67±1.70 ^a	13.000**	41.00±1.63 ^a	44.67±1.70 ^a	1.677
8 Gy	66.33±2.05 ^{ab}	62.67±1.70 ^{ab}	1.677	57.33±2.05 ^{ab}	54.33±1.70 ^{ab}	5.196*
<i>F</i>	122.500**	95.370**		138.400**	76.490**	

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 2 Gy 比较, ^a $P<0.05$; 与 4 Gy 比较, ^b $P<0.05$

2.3 不同的放疗分割方式对小鼠肿瘤体积的影响
在 X 射线照射后的第 3、7 和 14 天, 与单肿瘤组相比, 低、中、高剂量的 X 射线均能使肿瘤体积缩小, 且差异均有统计学意义($F_{\text{组间}}=295.843, F_{\text{时间}}=340.743, F_{\text{交互}}=297.523$, 均 $P<0.001$; 各组与单肿瘤组比较均 $P<0.05$)。在 X 射线照射后的第 3、7、14 和 21 天, 中、高剂量组小鼠的肿瘤体积与低剂量组相比有所缩小, 且差异具有统计学意义($F_{\text{组间}}=205.582, F_{\text{时间}}=367.846, F_{\text{交互}}=267.144$, 均 $P<0.001$; 各组与低剂量组比较均 $P<0.05$)。中、高剂量组小鼠的肿瘤体积在 X 射线照射后任意时间的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。截至第 21 天, 单肿瘤组和低剂量组小鼠全部死亡。从照射后第 7 天开始, 3 组小鼠的瘤体在不同程度上增大, 低剂量组小鼠瘤体增速更快, 见图 2。



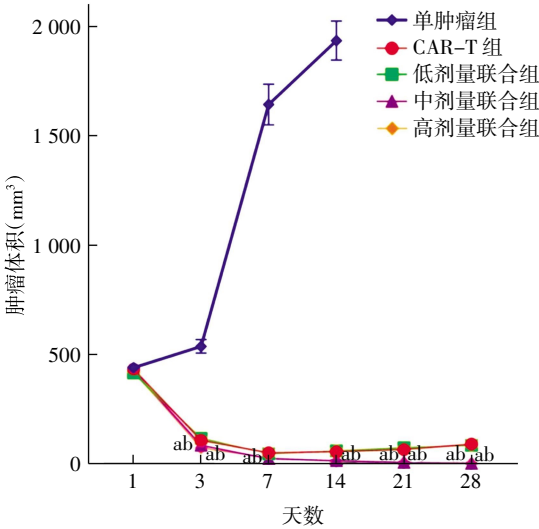
注: 与单肿瘤组比较, ^a $P<0.05$; 与低剂量组比较, ^b $P<0.05$

图 2 不同剂量的 X 射线对小鼠肿瘤体积的影响

Fig.2 Effects of different X-ray dosages on tumor volume in mice

2.4 不同的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞对大块型淋巴瘤小鼠的疗效 用于协同治疗的 CAR-T 细胞的初始转染率为 53%, 各组小鼠的初始肿瘤体积差异均无统计学意义($F=0.159, P>0.05$)。结果显示, 在 CAR-T 细胞输注后 28 d 内, CAR-T 组与低剂

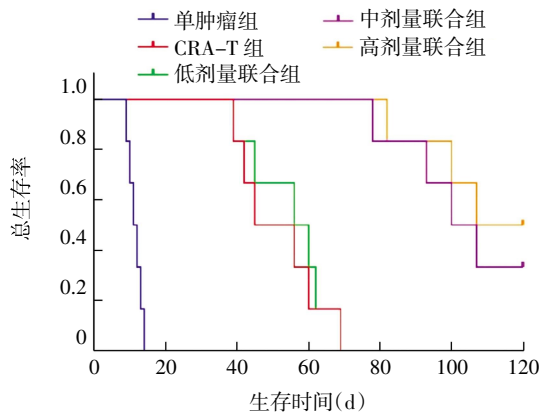
量联合组小鼠的肿瘤体积变化趋势相近, 且组间未见明显差异(在各测量时间点均 $P>0.05$), 与以上两组相比, 中、高剂量联合组小鼠的肿瘤体积均缩小显著(在各测量时间点, 各组间均 $P>0.05$), 并且未见重新增大的迹象($F_{\text{组间}}=1\ 052.364, F_{\text{时间}}=14\ 861.095, F_{\text{交互}}=49.864$, 均 $P<0.001$), 见图 3。各组小鼠的中位生存时间分别是 12、51、58、104 和 114 d。CAR-T 组与低剂量联合组间相比[$HR=1.339(0.349\sim5.133)$, $Log-rank\chi^2=0.181, P>0.05$], 中、高剂量联合组间相比[$HR=1.654(0.349\sim7.835)$, $Log-rank\chi^2=0.402, P>0.05$], 小鼠生存时间差异均无统计学意义。与低剂量联合组相比, 中剂量联合组和高剂量联合组[$HR=21.880(3.884\sim124.600)$, $Log-rank\chi^2=12.090, P<0.01$]小鼠生存期均明显延长, 见图 4。



注: CAR-T: CD19 嵌合抗原受体 T; 与低剂量联合组比较, ^a $P<0.05$; 与 CAR-T 组比较, ^b $P<0.05$

图 3 不同的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞对异种移植淋巴瘤小鼠肿瘤体积的影响

Fig.3 Effects of different radiotherapy segmentation modalities combined with CAR-T cells on tumor volume in xenograft lymphoma mice

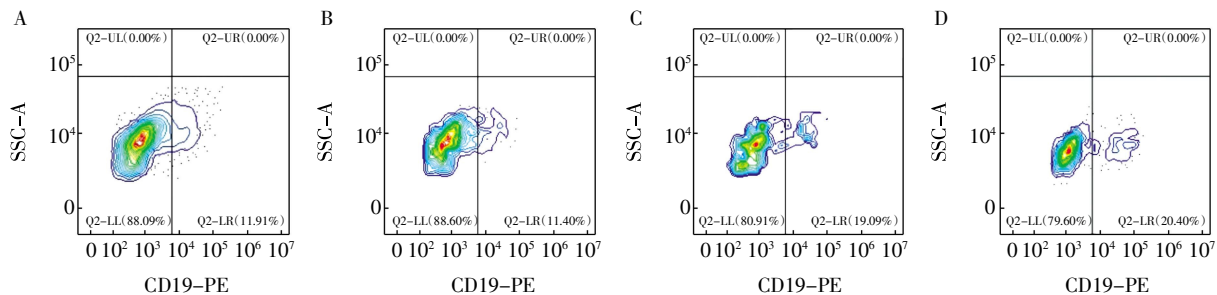


注: CAR-T:CD19 嵌合抗原受体 T

图4 不同的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞对异种移植淋巴瘤小鼠存活时间的影响

Fig.4 Effect of different radiotherapy segmentation modalities combined with CAR-T cells on survival time of xenograft lymphoma mice

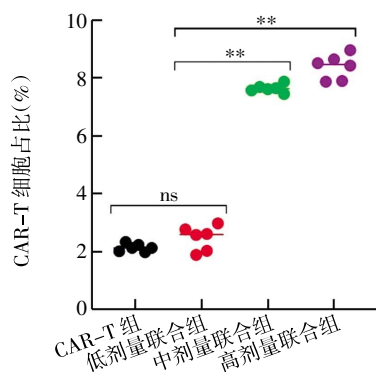
2.5 不同的放疗分割方式对 CAR-T 细胞增殖及肿瘤浸润 CAR-T 细胞的影响 CAR-T 细胞在小鼠体



注: CAR-T:CD19 嵌合抗原受体 T; A: CAR-T 组; B: 低剂量联合组; C: 中剂量联合组; D: 高剂量联合组

图5 CAR-T 细胞输注后第3天,各组小鼠外周血中 CAR-T 细胞占 T 淋巴细胞的比例

Fig.5 Ratio of CAR-T cells to T lymphocytes in the peripheral blood of mice in each group on the 3rd day after CAR-T cells infusion



注: CAR-T:CD19 嵌合抗原受体 T; ** $P < 0.01$

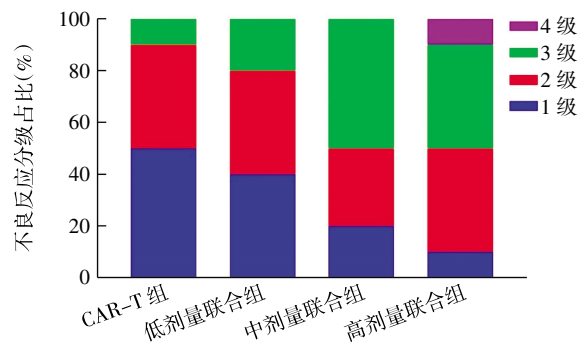
图6 CAR-T 细胞输注后第14天,各组小鼠肿瘤内部 CAR-T 细胞占 T 淋巴细胞的比例

Fig.6 Ratio of CAR-T cells to T lymphocytes in tumor of mice in each group on the 14th day after CAR-T cells infusion

2.6 不同的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞治疗的不良反应 在输注 CAR-T 细胞后,低剂量联合组出现 3 级以上不良反应的小鼠有 2 只,中等剂量联

内的扩增高峰时间为第3天,此时,单 CAR-T 组及低、中、高剂量联合组小鼠外周血中的 CAR-T 细胞占 T 淋巴细胞比例的中位数分别为 11.28%、12.51%、18.75%和 20.40%,组间差异无统计学意义($F=0.910$, $P>0.05$),见图 5。此后,各组小鼠外周血中的 CAR-T 细胞均减少至难以被检测出。至于瘤内浸润 CAR-T 细胞,在 CAR-T 细胞输注后第 14 天,单纯 CAR-T 组和低、中、高剂量联合组小鼠的 CAR-T 细胞比例分别为 $(2.13 \pm 0.11)\%$ 、 $(2.77 \pm 0.21)\%$ 、 $(7.63 \pm 0.49)\%$ 和 $(8.53 \pm 0.62)\%$,组间差异有统计学意义($F=484.400$, $P<0.05$)。与单纯 CAR-T 组相比,低剂量联合组的瘤内浸润 CAR-T 细胞比例未见增加($P>0.05$),中($t=68.810$, $P<0.05$)、高($t=34.040$, $P<0.05$)剂量联合组则均明显增加。与低剂量联合组相比,中($t=28.200$, $P<0.05$)、高($t=23.960$, $P<0.05$)剂量联合组瘤内浸润 CAR-T 细胞比例均明显增加。中、高剂量联合组组间瘤内浸润 CAR-T 细胞的差异无统计学意义($P>0.05$)。

合组 5 只,高剂量联合组 5 只,其中高剂量联合组中有 1 只小鼠在 CAR-T 细胞治疗后第 1 天的不良反应评级达到 4 级,给予甲强龙干预后好转。各组小鼠不良反应分级的具体情况见图 7。此外,每组小鼠在 CAR-T 细胞输注后第 0、7、14、21、28 和 35 天的体重差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。



注: CAR-T:CD19 嵌合抗原受体 T

图7 各组小鼠的不良反应分级情况

Fig.7 Classification of adverse reactions in each group of mice

表2 不同的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞治疗小鼠的体重变化($n=6, \bar{x} \pm s, g$)Tab.2 Weight changes in mice treated with different radiotherapy methods combined with CAR-T cells($n=6, \bar{x} \pm s, g$)

组别	D 0	D 7	D 14	D 21	D 28	D 35
低剂量联合组	25.90±0.40	25.70±0.36	25.35±0.24	24.92±0.27	24.18±0.18	23.75±0.25
中剂量联合组	26.03±0.15	25.60±0.32	25.18±0.22	24.78±0.30	24.15±0.20	23.73±0.34
高剂量联合组	25.85±0.34	25.53±0.26	24.95±0.35	24.60±0.28	24.18±0.20	23.92±0.20
<i>F</i>	0.457	0.349	2.636	1.584	0.051	0.725

注: CAR-T: CD19 嵌合抗原受体 T; $F_{\text{组间}}=0.415, P=0.668$; $F_{\text{时间}}=308.838, P<0.001$; $F_{\text{交互}}=2.054, P=0.076$

3 讨论

随着 CAR-T 细胞的发展,生物免疫疗法已为 B 细胞淋巴瘤的治疗模式带来了革命性的变化^[11-12]。然而,长期的随访数据显示,接受 CD19 CAR-T 细胞治疗的患者中有 10%~20% 对治疗无反应,最初有效的患者也有一半左右会在 1 年内复发。具有大块型肿物特征是影响 CAR-T 细胞治疗淋巴瘤疗效的独立危险因素之一^[3]。与其他血液系统恶性肿瘤不同,淋巴瘤大块更类似于实体肿瘤,其复杂的肿瘤微环境限制了 CAR-T 细胞与肿瘤细胞的接触,使之难以发挥肿瘤杀伤作用^[13]。放疗是大块型淋巴瘤的一种重要治疗手段,但其虽然可以暂时使局部肿瘤缩小,却也难以持久地控制肿瘤进展^[14]。当前,已有多项研究将放疗与免疫疗法联用以治疗实体性肿瘤^[15-16]。最新的多中心研究数据也显示,放疗与 CAR-T 细胞联合能使复发/难治性非霍奇金淋巴瘤患者获益^[17]。然而,放疗在与 CAR-T 疗法等多种免疫治疗联用时的最优使用剂量、次数、时间和次序仍存在争议^[18]。对于复发/难治性 B 细胞淋巴瘤患者,目前常规的局部放疗方式为在数周内每天以小剂量照射,作为非治愈性姑息治疗^[19]。Qu 等^[20]的临床试验也通过联合使用传统的放疗方案与 CAR-T 细胞获得了可喜的疗效。然而, Dutt 等^[21]的动物实验却发现,加速的放疗分割方式能比传统方式更好的诱导 T 细胞介导的免疫作用。综上,探讨大块型淋巴瘤中最佳的放疗与 CAR-T 细胞联用方式具有重要意义。

本研究首先证实,单纯放疗不足以根除淋巴瘤细胞。单次照射剂量的增加虽能显著提升 X 射线对淋巴瘤细胞株的杀伤能力,但高剂量照射组的 24 h 杀伤率仍然较低。动物实验也显示,不同分割方式的放疗虽可以短暂地使小鼠肿瘤体积缩小,但在治疗后第 2 周却均观察到肿瘤的再次生长。随后,通过将不同的放疗分割方式(包括模拟传统放疗分割方式:2 Gy×5 d, 1 次/d, 和大分割方式:4 Gy×5 d, 1 次/d、8 Gy×3 d, 1 次/d)与 CAR-T 细胞联用,本研究发现,不同组合方式对大块肿瘤的控制及疗效的持久性

存在显著差异,大分割方式放疗能与 CAR-T 细胞协同,迅速且持久地控制肿瘤体积,该组小鼠肿瘤组织内 CAR-T 细胞的浸润也有所增多。需要指出,本研究之所以选择在放疗后第 24 小时输注 CAR-T 细胞,是因为考虑到放疗预处理后的淋巴细胞减低窗口期可能有助于 CAR-T 细胞的扩增,这类似于在 CAR-T 细胞输注前应用氟达拉滨及环磷酰胺等化疗药物进行的预处理^[22]。最后,大分割方式组小鼠的不良反应如体重减轻和疼痛程度等虽有所增加,但大多在可耐受范围内,极少数不良反应过强的小鼠也可在激素干预后恢复正常状态。

本研究的局限在于:第一,仅从细胞及动物模型层面验证了大分割方式放疗和 CD19CAR-T 细胞治疗大块型淋巴瘤的有效性和安全性,暂未通过临床试验进行验证。第二,由于检测方式的限制,肿瘤微环境中凋亡相关蛋白、细胞因子、趋化因子等成分的变化未可知。第三,本研究目前只是观察了不同的放疗方式与 CAR-T 细胞协同治疗大块型淋巴瘤的现象,还暂未对相关机制进行探讨,后续还需对此进行更深入地研究。

综上,本研究初步探索了不同的放疗分割方式联合 CD19 CAR-T 细胞在巨块型淋巴瘤中的疗效差异,有望为今后的临床转化提供新思路。

参考文献:

- [1] 张锡友,李丹丹,陈峰,等. Car-T 治疗 B 细胞淋巴瘤疗效研究的 Meta 分析[J]. 天津医药, 2018, 46(12): 1330-1335.
- [2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)淋巴瘤诊疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023: 1-297.
- [3] 肖霞,袁婷,孟娟霞,等. CD19 嵌合抗原受体 T 细胞治疗复发难治 B 细胞淋巴瘤患者效果不佳的因素分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(8): 593-598.
- [4] ALARCON T A, FEIN J A, FRIED S, et al. Outcomes of first therapy after CD19-CAR-T treatment failure in large B-cell lymphoma[J]. Leukemia, 2022, 37(1): 154-163.
- [5] BROOKS E D, FANG P, PINNIX C C. Salvage radiotherapy for primary refractory and relapsed diffuse large B-Cell lymphoma[J]. Br J Radiol, 2021, 94(1127): 20210360.
- [6] TURGEON G A, WEICKHARDT A, AZAD A A, et al. Radiotherapy

(下转第 322 页)

- 2022,20(1):127.
- [7] YIN M, WANG X, LU J. Advances in IKBKE as a potential target for cancer therapy[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(1):247-258.
- [8] MESSEHA S S, ZARMOUH N O, ANTONIE L, et al. Sanguinarine inhibition of TNF- α -induced CCL2, IKBKE/NF- κ B/ERK1/2 signaling pathway, and cell migration in human triple-negative breast cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8329.
- [9] GÖKTUNA S İ. IKBKE inhibits TSC1 to activate the mTOR/S6K pathway for oncogenic transformation[J]. *Turk J Biol*, 2018, 42(4):268-278.
- [10] BAINBRIDGE A, WALKER S, SMITH J, et al. IKBKE activity enhances AR levels in advanced prostate cancer via modulation of the Hippo pathway[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(10):5366-5382.
- [11] CHALLA S, HUSAIN K, KIM R, et al. Targeting the I κ B kinase enhancer and its feedback circuit in pancreatic cancer [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(2):481-489.
- [12] REMOLI A L, SGARBANTI M, PERROTTI E, et al. I κ B kinase- ε -mediated phosphorylation triggers IRF-1 degradation in breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(10):459-469.
- [13] CATALANO C, DA SILVA FILHO M I, FRANK C, et al. Epistatic effect of TLR3 and cGAS-STING-IKK ε -TBK1-IFN signaling variants on colorectal cancer risk[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(4):1473-1484.
- [14] 余冬. IKBKE 在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌生物学行为的影响[D]. 天津医科大学, 2020.
- [15] 郭高超. IKBKE 通过磷酸化 Amlt2 促进 YAP1 的表达调控脑胶质瘤恶性进展的机制研究[D]. 天津医科大学, 2020.
- [16] 李俊, 余冬, 孔德刚, 等. IKBKE 和 NF- κ B 在胰腺癌中的表达及沉默 IKBKE 对胰腺癌细胞增殖、迁移的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2020, 26(4):274-280.
- [17] ZHU M, WANG M, YANG F, et al. miR-155-5p inhibition promotes the transition of bone marrow mesenchymal stem cells to gastric cancer tissue derived MSC-like cells via NF- κ B p65 activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16567-80.
- [18] 郭彩丽. IKBKE 通过激活 AKT/NF- κ B 信号通路调控胶质瘤的生长过程及增强胶质瘤的抗药性[D]. 河南: 郑州大学, 2019.
- [19] GUO G, SUN Y, HONG R, et al. IKBKE enhances TMZ-chemoresistance through upregulation of MGMT expression in glioblastoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(8):1252-1262.
- [20] HARQUAIL J, LEBLANC N, LANDRY C, et al. Pax-5 inhibits NF- κ B activity in breast cancer cells through IKK ε and miRNA-155 effectors[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2018, 23(3):177-187.
- (2023-12-19 收稿)

++++++
(上接第 315 页)

- and immunotherapy: a synergistic effect in cancer care[J]. *Med J Aust*, 2019, 210(1):47-53.
- [7] WEISS T, WELLER M, GUCKENBERGER M, et al. NKG2D-based CAR T cells and radiotherapy exert synergistic efficacy in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4):1031-1043.
- [8] ZHANG Y, DING Z, PERENTESIS J P, et al. Can rational combination of ultra-high dose rate FLASH radiotherapy with immunotherapy provide a novel approach to cancer treatment?[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2021, 33(11):713-722.
- [9] 柴笑, 金鑫, 赵明峰. 靶向 CLL-1 嵌合抗原受体 T 细胞的构建及其功能验证[J]. *中华血液学杂志*, 2022, 43(2):102-106.
- [10] 肖霞. 改进的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤的作用研究[D]. 天津医科大学, 2022.
- [11] 韩为东, 张亚晶. CAR-T 细胞治疗淋巴瘤——我们仍然在路上[J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(9):612-615.
- [12] 赵培起, 张会来. 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中的研究进展[J]. *天津医药*, 2020, 48(1):71-75.
- [13] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4):69.
- [14] TOKOLA S, KUITUNEN H, TURPEENIEMI-HUJANEN T, et al. Significance of bulky mass and residual tumor-treated with or without consolidative radiotherapy-to the risk of relapse in DLBCL patients[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(6):1966-1977.
- [15] HERRERA F G, IRVING M, KANDALAFT L E, et al. Rational combinations of immunotherapy with radiotherapy in ovarian cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(8):e417-e433.
- [16] TURCHAN W T, PITRODA S P, WEICHSELBAUM R R. Radiotherapy and immunotherapy combinations in the treatment of patients with metastatic disease: current status and future focus[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(19):5188-5194.
- [17] SAIFI O, LESTER S C, BREEN W G, et al. Incorporating radiation with anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma: a multicenter consensus approach[J]. *Am J Hematol*, 2024, 99(1):124-134.
- [18] HOVHANNISYAN L, RIETHER C, AEBERSOLD D M, et al. CAR T cell-based immunotherapy and radiation therapy: potential, promises and risks[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1):82.
- [19] NG A K, YAHALOM J, GODA J S, et al. Role of radiation therapy in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 100(3):652-669.
- [20] QU C, PING N, KANG L, et al. Radiation priming chimeric antigen receptor T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with high tumor burden[J]. *J Immunother*, 2020, 43(1):32-37.
- [21] DUTT S, ATALLAH M B, MINAMIDA Y, et al. Accelerated, but not conventional, radiotherapy of murine B-cell lymphoma induces potent T cell-mediated remissions[J]. *Blood Adv*, 2018, 2(19):2568-2580.
- [22] 王玉洁, 王桃, 杨建民. 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法预处理方案的研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2020, 43(1):77-81.
- (2024-02-01 收稿)