

CIK 细胞在免疫缺陷 NPG 小鼠体内重复给药毒性研究

黄瑛¹, 刘静维², 侯田田¹, 文海若¹, 秦超¹, 卢戌^{2*}, 耿兴超^{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. 康爱瑞浩生物医药(浙江)股份有限公司, 浙江 嘉兴 314100)

摘要:目的 采用重度免疫缺陷 NPG 小鼠模型对细胞因子诱导的杀伤性(CIK)细胞治疗产品进行毒性研究, 考察多次给药后的毒性反应, 为临床应用提供安全性依据。方法 采用 NPG 小鼠, 设主实验组和卫星组两个大组, 每大组分为溶媒对照组、低剂量组(每只小鼠给予 2×10^6 个细胞)和高剂量组(每只小鼠给予 3×10^7 个细胞)。每两周给药 1 次, 共给药 6 次, 恢复期 28 d。实验期间, 主实验组动物进行临床症状观察、体质量和摄食量测定, 并于给药期结束和恢复期结束后解剖采血, 进行血液学和血清生化检查、细胞因子检测、脏器称重和病理学检查。卫星组动物于首次给药和末次给药前、给药后 3 h、1、3、10 d 以及恢复期结束后采血, 进行细胞表型分析, 以考察 CIK 细胞的分布情况。结果 在低剂量组重复给药 6 次, 小鼠未见明显毒性反应, 仅个别动物出现弓背、摄食量下降和葡萄糖(GLU)、总胆固醇(CHO)升高等症状, 血液中仅在首次给药后 1 d 和末次给药后个别时间点(3 h、10 d、29 d)检测到少量 CIK 细胞。高剂量组重复给药 6 次, 小鼠血液中可检测较高水平的 CIK 细胞, 血清中 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 2(IL-2)等具有肿瘤杀伤作用的细胞因子升高, 同时小鼠出现明显的移植排斥反应(graft-versus-host disease, GvHD), 表现为动物临床症状、体质量、摄食量、血液学和血清生化等多个指标的变化、动物多脏器发生混合细胞聚集和 GvHD 相关的病变。结论 NPG 小鼠重复给予 CIK 细胞, 在每只小鼠给予 2×10^6 个细胞的剂量(临床拟用剂量)下动物未见显著的毒性反应; 在每只小鼠给予 3×10^7 个细胞剂量下动物出现与异种细胞移植相关的 GvHD 反应, 未见其他相关的毒理学反应。该结果为 CIK 细胞进入临床试验奠定了基础。

关键词: 细胞治疗; 细胞因子诱导的杀伤性细胞; 免疫缺陷小鼠; 安全性

doi: 10.11669/cpj.2024.20.003 中图分类号: R96 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)20-1899-11

Toxicity Study of Cytokine Induced Killer Cells in Immunodeficient NPG Mice

HUANG Ying¹, LIU Jingwei², HOU Tiantian¹, WEN Hairuo¹, QIN Chao¹, LU Xu^{2*}, GENG Xingchao^{1*} (1. The Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Karh Biohealthcare Biotechnology (Zhejiang) Co., Ltd., Jiaxing 314100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide safety basis for clinical application, and evaluate the toxicity of CIK cells by repeated administration of CIK cells in severe immunodeficient NPG mouse model. **METHODS** The NPG mice were randomized into two groups: the main experimental group and the satellite group. Each group was divided into vehicle control group, low dose group (2×10^6 cells per mouse) and high dose group (3×10^7 cells per mouse). The CIK cells were given every two weeks for 6 times with 28-day recovery. During the experiment, the clinical symptoms, body weight and food intake were observed in the main experimental group. Blood samples were dissected and collected at the end of the administration period and recovery period, and the hematology, serum biochemical examination, cytokine detection, organ weighing and pathological examination were performed. The blood samples of satellite animals were collected to investigate the distribution of CIK cells before the first and last administration, 3 h, 1 d, 3 d, 10 d after the administration, and after the recovery period. **RESULTS** After repeated administration for 6 times at low dose, no obvious toxic reaction was observed in mice. A few CIK cells were detected in the blood at 1 day after the first dose and at some time points (3 h, day 10, day 29) after the last dose. High levels of CIK cells were detected in the blood of mice after repeated administration of 6 times at high dose. The levels of IFN- γ , TNF, IL-10, IL-2 and IL-10 in serum were increased. At the same time, significant graft-versus-host disease (GvHD) reaction was observed in mice, including the changes of clinical symptoms, body weight, food intake, hematology and serum biochemistry, mixed cell aggregation and GvHD-related lesions occurred in multiple organs of animals. **CONCLUSION** The data from the study indicates that no significant toxic reaction was observed at the dose of 2×10^6 cells per mouse (the clinical dosage). GvHD associated with xenotransplantation was observed at a dose of 3×10^7 cells per mouse, and no other related toxicity was

基金项目: 国家重点研发计划课题资助(2021YFA1101602); 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金资助(GJJS-2022-6-1)

作者简介: 黄瑛, 女, 博士, 副研究员 研究方向: 药物毒理研究 * 通讯作者: 卢戌, 男, 博士, 正高级工程师 研究方向: 生物医药开发研究 Tel: (010)80498890; 耿兴超, 男, 博士, 研究员 研究方向: 药物毒理研究 Tel: (010)62876255

observed. These data will facilitate CIK cells to enter into clinical trials.

KEY WORDS: immunocyte therapy; CIK cells; immunodeficient mice; safety

细胞因子诱导的杀伤性(cytokine-induced killer, CIK)细胞是将人外周血单核细胞在体外条件下经 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素2(IL-2)、抗CD3单抗等多种细胞因子刺激作用后获得,通过诱导肿瘤细胞裂解并分泌多种具有直接细胞毒活性或抑制作用的细胞因子的方式,发挥抗肿瘤活性^[1-4]。作为一种过继性细胞疗法,将体外培养的CIK细胞回输至患者体内后,对血液瘤和实体瘤均有显著的治疗效果^[5-7]。同时,商品化使用的CIK细胞治疗产品多为患者自体同源细胞诱导培养,在临床应用的过程中不会造成患者出现免疫排斥或移植物抗宿主反应(graft-versus-host disease, GvHD)等不良反应,具有理想的抗肿瘤药物特性,故CIK细胞是目前免疫细胞治疗领域极具热点的研究方向之一^[8-11]。

免疫细胞治疗产品的非临床安全性评价是推进其临床转化应用的关键环节,尽管已有多项研究使用不同的动物模型进行了不同制备方式的CIK细胞的药效和毒理学研究^[12],但是这些研究只是在使用少量动物模型的基础上进行的药效评价和简化的安全性评价,仍处于实验研究的阶段,并没有建立符合非临床研究规范的实验动物模型和检测指标,多数实验条件也无法达到药物非临床研究质量管理规范(good laboratory practice, GLP)的要求。另外,针对不同的CIK细胞产品,都需要进行独立的非临床研究实验。为此,本研究在符合GLP要求的实验条件下,使用免疫缺陷NPG小鼠模型对1例特定的CIK细胞治疗产品进行了生物分布研究和重复给药毒理学研究,完善了该产品的非临床研究数据,为开展该产品和其他CIK细胞治疗产品的非临床研究提供了支持,也为该产品进行新药临床试验申请(IND)申报并设计临床试验中人用剂量和毒副作用监测提供了数据支持和参考依据。

1 材料

1.1 供试品和对照品

CIK细胞注射液,浓度分别为每毫升 5×10^6 、 7.5×10^7 个细胞,浅黄色半透明细胞混悬液,4~8℃保存,给药当天制备[康爱瑞浩生物医药(浙江)股份有限公司]。

CIK细胞溶媒,0.9%氯化钠注射液(含体积分

数20%人血白蛋白注射液),浅黄色透明液体,4~8℃保存,给药当天制备[康爱瑞浩生物医药(浙江)股份有限公司]。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 Per-CP mouse anti-human CD3(批号:8124735)、PE mouse anti-human CD4(批号:9172628)、FITC mouse anti-muman CD8(批号:7312538)、Th1/Th2细胞因子检测试剂盒(批号:551809)(美国BD Pharmingen公司);Anti-human CD45(批号:2138102,深圳NeoBioscience公司)。

1.2.2 主要仪器 流式细胞仪(型号:FACS Calibur,美国BD公司);自动生化分析仪(型号:HITACHI 7180,日本日立公司);血液检查仪(型号:ADVIA120,德国西门子公司);脱水机(型号:LEICA ASP300)、切片机(型号:SAKURAIVS-410)、全自动染色机(型号:SAKURA Tissue-TekDRS-2000)、包埋机(型号:SAKURA Tecc 4714)、封片机(型号:SAKURA Tissue-TEKGLAS C410)(日本樱花公司);生物显微镜(型号:OLYMPUS BX51,日本奥林巴斯公司)。

1.3 实验动物的饲养和管理

NPG小鼠270只,雌雄各半,5~6周龄,体质量约18~27g,购于北京维通达生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0002。动物质量合格证号:1103412011000507。动物饲养于SPF屏障系统,每天上、下午各1次对动物进行观察,饲养室12h照明,温度20~25℃,日温差 ≤ 3 ℃,湿度40%~70%,换气次数每小时10~20次。

2 方法

2.1 动物分组给药以及毒理学指标观测

试验共使用270只小鼠,根据不同测定项目分别分为主实验组和卫星组两大项目组,每个大项目组设置3个剂量组:溶媒对照组、低剂量(每只动物给予 2×10^6 个细胞)组及高剂量(每只动物给予 3×10^7 个细胞)组。主实验组进行常规毒性检查、血清生化测定、血液学测定、细胞因子测定和病理学检查;卫星组进行细胞因子、CIK细胞表型测定。各组动物尾静脉注射给予溶媒或CIK细胞注射液,每2周给药1次,共给药6次,给药体积为每只动物400 μ L。恢复期为28d。实验设计概况见图1。

2.2 CIK 细胞表型测定

首次给药和末次给药前、给药后 3 h、1、3、10 d；末次给药后 29 d 对卫星组动物采血，每管样本加入荧光标记 CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ 抗体 5 μL，避光孵育

20 min，加入适量磷酸缓冲盐溶液（PBS）洗液，1 000 r·min⁻¹离心 5 min，弃上清，反复洗涤 2 次，用 FACS Calibur 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞的数量。

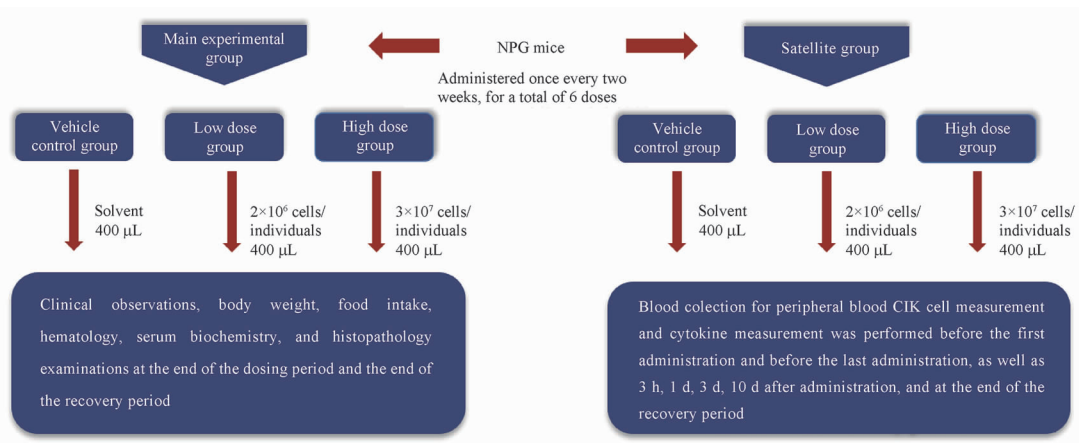


图 1 重度免疫缺陷 NPG 小鼠给药组别以及毒理学检测指标设置

Fig. 1 Animal grouping, dose setting and toxicological detection index setting of severe immunodeficient NPG mice

2.3 小鼠血清 IFN- γ 水平测定

首次给药后第 30 天、末次给药后第 1 天、末次给药后第 29 天对动物采血，应用 Th1/Th2 细胞因子检测试剂盒进行人源细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-2、TNF、IL-4 测定。按照试剂盒说明书推荐操作步骤进行，在流式管中加入 50 μL 混合微球；在标准品管中，每管加入 50 μL 标准品系列液（S1 ~ S10），在样本管中，每管加入 50 μL 待测血清；所有实验管加入 50 μL Th1/Th2-II PE 检测试剂。加入后，用手轻弹混匀；置于室温避光孵育 3 h。孵育结束，每管加入 1 mL 洗液，用手轻弹样本管，200 r·min⁻¹离心 5 min；离心后小心倾倒上清液，每管加入 300 μL 洗液，用手重悬微球，上机测定。

2.4 组织病理学检查

对于预定解剖动物麻醉后（腹腔注射硫喷妥钠，麻醉剂量 60 mg·kg⁻¹）先采血，经腹腔后大静脉采血后，完全放血处死后进行解剖，摘取脏器后直接固定，睾丸、附睾、眼球用 Davidson's 固定液固定，其他脏器用体积分数 10% 中性甲醛固定，组织经修块取材，逐级乙醇脱水，石蜡包埋，滑动切片切片机切片（厚约 3 μm），经苏木精-伊红（HE）染色，光镜检查。

2.5 数据的统计与处理

对于体质量、摄食量、血液学指标、血清生化检查、绝对脏器重量和相对脏器质量、细胞因子测定等数据均按照以下方法统计：①首先用 Bartlett 检验方

法进行数据均一性检验，如果数据均一（检验 $P > 0.05$ ），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 Dunnett 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 Dunnett 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

低剂量组雌性动物个别动物出现弓背，高剂量组动物试验期间多出现弓背、竖毛、脱毛、活动减少、双侧眯眼、死亡（图 2），结合组织病理学检查发现动物多组织器官可见混合细胞聚集，以及多个组织器官变性或坏死以及纤维化等组织病理学改变，认为上述症状与受试物细胞给予后在各组织器官的滞留以及受试物（人源细胞）给予 NPG 小鼠后产生 GvHD 反应相关。

3.2 体质量测定结果

与溶媒对照组相比，给药期给药第 45 天至第 66 天，高剂量组的雄性动物体质量显著下降（ $P < 0.01$ ）；给药第 38 天至第 66 天，高剂量组的雌性动物体质量显著下降（ $P < 0.01$ ）。恢复期第 3 天

至第 28 天,高剂量组的雄性动物和雌性动物体质量与同期溶媒对照组动物相比体质量均显著下降

($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量组雌性动物体质量也有降低趋势。见图 3。

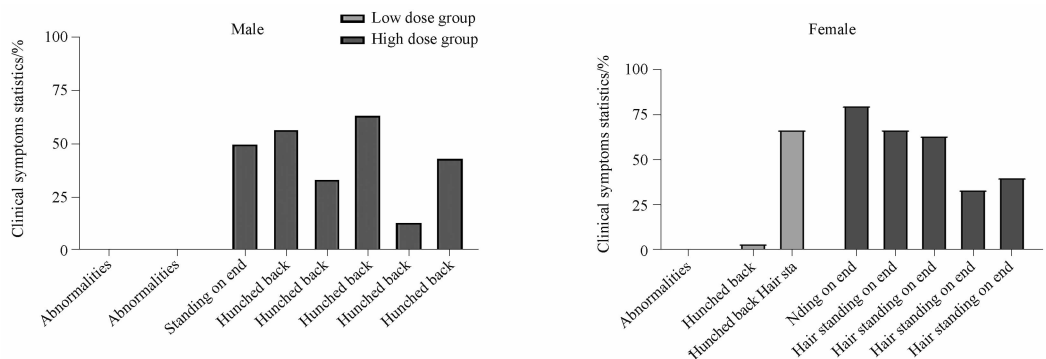
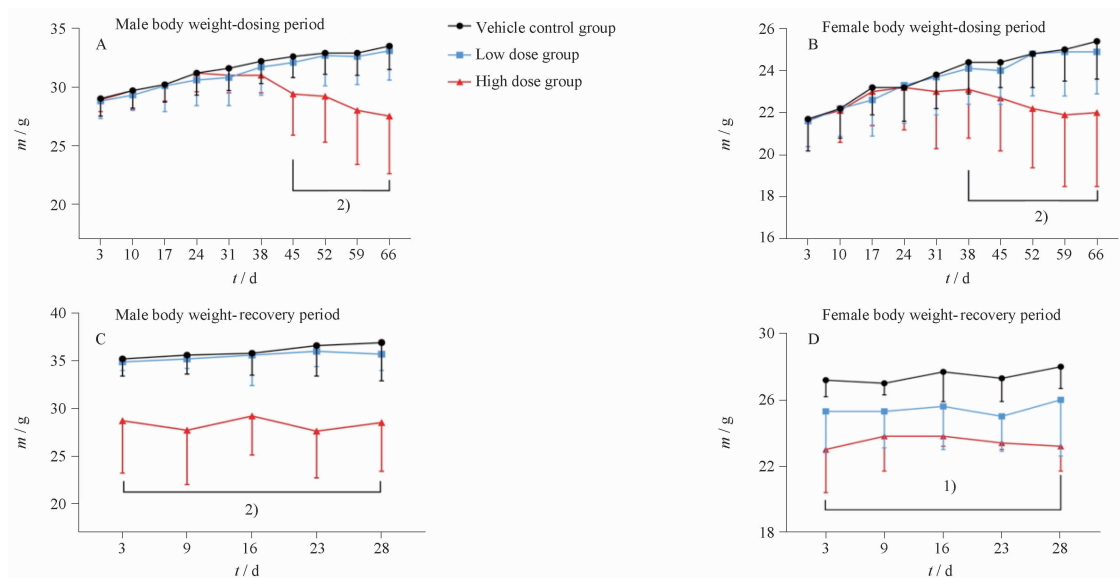


图 2 细胞因子诱导的杀伤性(CIK)细胞给药后 NPG 小鼠临床症状观察结果

Fig. 2 The clinical symptoms of NPG mice after administration of CIK cells



A - 给药期雄性动物体质量;B - 给药期雌性动物体质量;C - 恢复期雄性动物体质量;D - 恢复期雌性动物体质量;与溶媒对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

A - weight of male animals in dosing period; B - weight of female animals in dosing period; C - weight of male animals in recovery period; D - weight of female animals in recovery period; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the vehicle control group.

图 3 CIK 细胞重复给药后 NPG 小鼠体质量变化

Fig. 3 Changes of body weight after repeated administration of CIK cells

3.3 摄食量测定结果

与溶媒对照组相比,低剂量动物给药期摄食量未见统计学差异,但雌性动物恢复期第 23 天摄食量显著下降($P < 0.05$)且恢复期第 16 天与溶媒对照组相比也有一定程度下降,恢复期结束时(第 28 天)动物摄食量有所恢复,见图 4。

与溶媒对照组相比,高剂量组雄性动物给药第 45 天摄食量显著下降($P < 0.05$),给药第 31 天、第 38 天、第 52 天和第 59 天摄食量与溶媒对照组相比也有下降的趋势。与溶媒对照组相比,恢复期第 16 天,高剂量组雄性动物摄食量显著下降($P < 0.05$),

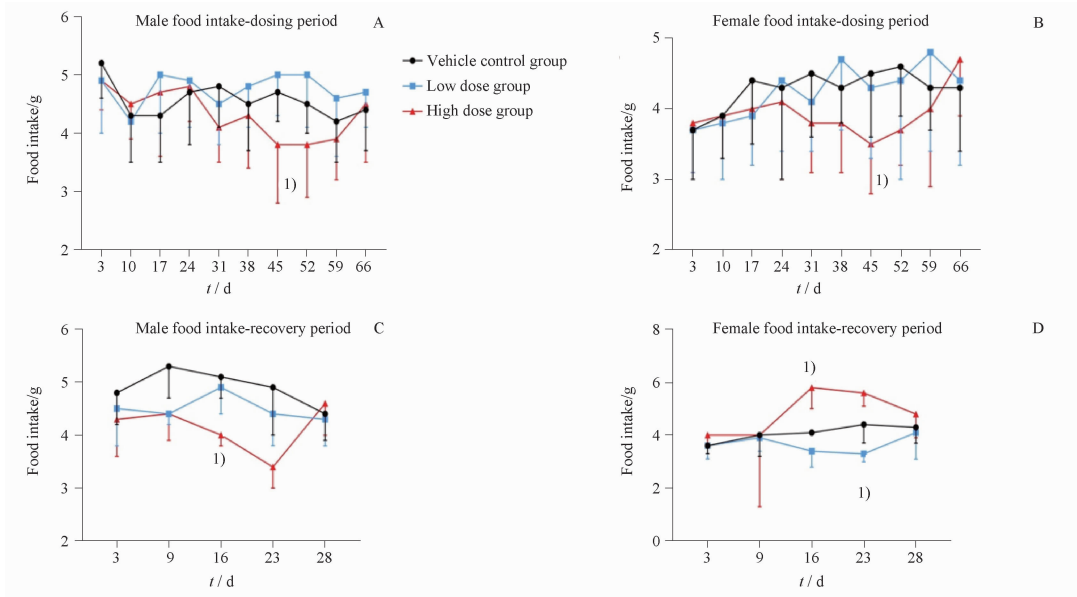
但恢复期结束时(第 28 天)雄性动物摄食量恢复。与溶媒对照组相比,高剂量组雌性动物给药第 45 天摄食量显著下降($P < 0.05$),给药第 17 天至第 38 天、第 52 天和第 59 天摄食量与溶媒对照组相比也有下降趋势。恢复期第 3 天至第 28 天,高剂量组雌性动物摄食量基本恢复正常。

3.4 血清生化与血液学检测结果

血清生化检测见表 1,与溶媒对照组相比,CIK 细胞在每只动物给予 2×10^6 个细胞的剂量下引起血糖(GLU)、总胆固醇(CHO)显著升高($P < 0.05$);在每只动物给予 3×10^7 个细胞的剂量下引起谷氨

酰转氨酶(GGT)、尿素氮(BUN)、Na⁺离子(Na⁺)、Cl⁻离子(Cl⁻)显著升高($P < 0.01$),肌酸磷酸激酶(CK)、总胆红素(TBIL)、CHO、总蛋白质(TP)、白蛋白(ALB)、白蛋白/球蛋白(A/G)、钾离子(K⁺)、甘油三酯(TG)显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),还会引

起乳酸脱氢酶(LDH)和GLU的显著改变(升高/降低)($P < 0.05, P < 0.01$),结合组织病理学检查结果进行分析,认为上述血液指标改变与CIK细胞给予后在各组织器官的滞留以及CIK细胞(人源细胞)给予小鼠后产生GvHD反应相关。



A - 给药期雄性动物摄食量; B - 给药期雌性动物摄食量; C - 恢复期雄性动物摄食量; D - 恢复期雌性动物摄食量; 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

A - food intake of male animals in dosing period; B - food intake of female animals in dosing period; C - food intake of male animals in recovery period; D - food intake of female animals in recovery period; ¹⁾ $P < 0.05$, compared with the vehicle control group.

图4 CIK细胞重复给药后动物摄食量变化。 $n = 12, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Changes of food intake after repeated administration of CIK cells. $n = 12, \bar{x} \pm s$

表1 CIK重复给药后NPG小鼠血清生化检查结果。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Results of serum biochemical examination after repeated administration of CIK cells in NPG mice. $n = 10, \bar{x} \pm s$

Examination	Male					
	1 d After the last administration			End of recovery period		
	Vehicle control group	Low dose group	High dose group	Vehicle control group	Low dose group	High dose group
GGT/U · L ⁻¹	0.81 ± 1.00	1.18 ± 0.39	2.45 ± 1.08 ²⁾	-	-	-
LDH/U · L ⁻¹	739 ± 205	730 ± 240	1 081 ± 291 ¹⁾	1 637 ± 683	793 ± 320	509 ± 295 ¹⁾
TBIL/μmol · L ⁻¹	5.35 ± 1.04	5.18 ± 0.87	2.97 ± 0.51 ²⁾	-	-	-
BUN/mmol · L ⁻¹	7.3 ± 0.9	7.0 ± 1.0	12.3 ± 2.7 ²⁾	8.0 ± 0.5	7.7 ± 0.9	13.8 ± 0.8 ²⁾
GLU/mmol · L ⁻¹	7.63 ± 0.82	8.42 ± 1.84	5.93 ± 1.26 ¹⁾	-	-	-
CHO/mmol · L ⁻¹	2.21 ± 0.47	2.15 ± 0.30	1.39 ± 0.05 ²⁾	-	-	-
TP/g · L ⁻¹	50.5 ± 3.6	47.8 ± 5.1	42.7 ± 3.2 ²⁾	-	-	-
ALB/g · L ⁻¹	20.8 ± 1.6	19.8 ± 2.2	16.9 ± 1.5 ²⁾	-	-	-
A/G	0.70 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.65 ± 0.05 ¹⁾	-	-	-
K ⁺ /mmol · L ⁻¹	5.23 ± 0.39	4.63 ± 0.79	4.06 ± 0.60 ²⁾	-	-	-
Na ⁺ /mmol · L ⁻¹	153.7 ± 1.7	153.8 ± 2.8	158.9 ± 4.0 ²⁾	153.8 ± 2.0	155.2 ± 0.9	158.9 ± 0.6 ²⁾
Cl ⁻ /mmol · L ⁻¹	109.9 ± 1.3	110.3 ± 2.3	116.4 ± 4.1 ²⁾	114.0 ± 3.0	113.8 ± 0.9	119.8 ± 0.4 ¹⁾
CK/U · L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
ALP/U · L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
TG/mmol · L ⁻¹	-	-	-	-	-	-
LDH/U · L ⁻¹	1 165 ± 229	926 ± 166	755 ± 304 ²⁾	-	-	-
TBIL/μmol · L ⁻¹	4.68 ± 1.03	4.82 ± 2.90	3.50 ± 1.04 ¹⁾	-	-	-

续表 1 (continued)

Examination	Gender		Female				
	Period group	1 d After the last administration			End of recovery period		
		Vehicle control group	Low dose group	High dose group	Vehicle control group	Low dose group	High dose group
BUN/mmol · L ⁻¹	7.2 ± 1.0	7.9 ± 1.4	9.5 ± 1.7 ²⁾	9.4 ± 2.2	9.5 ± 2.9	25.5 ± 10.2 ²⁾	
GLU/mmol · L ⁻¹	5.25 ± 0.93	6.79 ± 1.19 ¹⁾	6.79 ± 1.29 ¹⁾	-	-	-	
CHO/mmol · L ⁻¹	1.30 ± 0.21	1.59 ± 0.31 ¹⁾	1.32 ± 0.25	-	-	-	
TP/g · L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	
ALB/g · L ⁻¹	21.7 ± 1.9	21.2 ± 2.1	18.9 ± 1.1 ²⁾	-	-	-	
A/G	0.85 ± 0.05	0.81 ± 0.07	0.74 ± 0.04 ²⁾	-	-	-	
K ⁺ /mmol · L ⁻¹	5.23 ± 0.39	4.63 ± 0.79	4.06 ± 0.60 ²⁾	-	-	-	
Na ⁺ /mmol · L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	
Cl ⁻ /mmol · L ⁻¹	-	-	-	113.5 ± 2.4	114.5 ± 2.7	124.1 ± 3.0 ²⁾	
CK/U · L ⁻¹	255 ± 72	223 ± 43	172 ± 76 ¹⁾	-	-	-	
GGT/U · L ⁻¹	1.37 ± 0.55	1.43 ± 0.73	2.34 ± 0.72 ²⁾	1.81 ± 0.33	1.79 ± 0.36	2.72 ± 0.59 ¹⁾	
ALP/U · L ⁻¹	-	-	-	54 ± 15	44 ± 10	113 ± 37 ²⁾	
TG/mmol · L ⁻¹	-	-	-	0.56 ± 0.15	0.67 ± 0.10	0.17 ± 0.10 ¹⁾	

注: GGT - 谷氨酰转氨酶; LDH - 乳酸脱氢酶; TBIL - 总胆红素; BUN - 尿素氮; GLU - 血糖; CHO - 总胆固醇; TP - 总蛋白质; ALB - 白蛋白; A/G - 白蛋白/球蛋白; CK - 肌酸磷酸激酶; TG - 甘油三酯; ALP - 碱性磷酸酶; 与溶媒对照组比, ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

Note: GGT - glutamyltranspeptidase; LDH - lactic dehydrogenase; TBIL - total bilirubin; BUN - urea nitrogen; GLU - glucose; CHO - cholesterol; TP - total protein; ALB - albumin; A/G - albumin/globulin; CK - creatine phosphokinase; TG - triglyceride; ALP - alkaline phosphatase; ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, compared with the vehicle control group.

血液学检测见表 2, 与溶媒对照组相比, CIK 细胞在每只动物给予 2×10^6 个细胞的剂量下对血液学指标无显著影响, 在每只动物给予 3×10^7 个细胞的剂量下会引起动物淋巴细胞百分率 (LYMP%)、单核细胞 (MONO)、单核细胞百分率 (MONO%)、平均血小板体积 (MPV) 显著升高, 嗜碱性粒细胞 (BASO)、嗜碱性粒细胞百分率 (BASO%)、红细胞 (RBC)、血红蛋白浓度

(HGB)、红细胞比容 (HCT)、红细胞平均体积 (MCV)、红细胞平均血红蛋白量 (MCH)、血小板 (PLT) 显著降低, 且上述血液指标的变化在雌雄动物间具有较好的一致性。结合组织病理学检查结果进行分析, 认为上述血液学指标改变与 CIK 细胞给予后在各组织器官的滞留以及 CIK 细胞 (人源细胞) 给予小鼠后产生 GvHD 反应相关。

表 2 CIK 重复给药后 NPG 小鼠血液学检查结果。n = 10, $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 The results of the hematology examination after repeated administration of CIK cells in NPG mice. n = 10, $\bar{x} \pm s$

Gender	Male			Female		
	Vehicle control group	Low dose group	High dose group	Vehicle control group	Low dose group	High dose group
Lymph/%	72.3 ± 3.1	73.5 ± 5.2	88.4 ± 10.8 ²⁾	71.5 ± 5.8	68.4 ± 7.8	90.5 ± 3.5 ²⁾
MONO/ $10^9 \cdot L^{-1}$	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.05 ¹⁾	0 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01 ²⁾
HGB/g · L ⁻¹	125 ± 8	125 ± 6	91 ± 27 ¹⁾	125 ± 6	121 ± 7	74 ± 24 ²⁾
HCT/%	39.8 ± 2.3	39.7 ± 2.0	28.3 ± 8.4 ¹⁾	40.0 ± 2.3	39.2 ± 2.4	24.1 ± 7.7 ²⁾
MCV/fL	56.3 ± 1.9	55.1 ± 1.5	52.0 ± 1.5 ²⁾	-	-	-
MCH/pg	17.8 ± 0.7	17.3 ± 0.4	16.6 ± 0.5 ²⁾	-	-	-
PLT/ $10^9 \cdot L^{-1}$	742 ± 150	804 ± 307	394 ± 187 ¹⁾	742 ± 128	785 ± 56	316 ± 233 ²⁾
MPV/fL	6.9 ± 0.3	6.7 ± 0.3	7.5 ± 0.6 ¹⁾	6.9 ± 0.4	6.8 ± 0.2	7.8 ± 0.2 ²⁾
Baso/%	24.3 ± 3.4	24.6 ± 5.5	7.8 ± 11.1 ¹⁾	26.2 ± 5.7	29.4 ± 7.5	2.3 ± 3.6 ²⁾
MONO/%	-	-	-	0.7 ± 1.3	1.2 ± 1.2	6.5 ± 4.7 ²⁾
Baso/ $10^9 \cdot L^{-1}$	-	-	-	0.14 ± 0.08	0.21 ± 0.08	0.03 ± 0.05 ¹⁾
RBC/ $10^{12} \cdot L^{-1}$	-	-	-	7.22 ± 0.43	7.03 ± 0.51	4.39 ± 1.33 ²⁾

注: LYMPH - 动物淋巴细胞; MONO - 单核细胞; HGB - 血红蛋白浓度; HCT - 红细胞压积; MCV - 红细胞平均体积; MCH - 红细胞平均血红蛋白量; PLT - 血小板; MPV - 平均血小板体积; BASO - 嗜碱性粒细胞; RBC - 红细胞; 与溶媒对照组比, ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

Note: LYMPH - lymphocyte; MONO - monocyte; HGB - hemoglobin; HCT - hematocrit; MCV - mean corpuscular volume; MCH - mean corpuscular hemoglobin; PLT - platelet; MPV - mean platelet volume; BASO - basophilic granulocyte; RBC - red blood cell; ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, compared with the vehicle control group.

3.5 CIK 细胞在外周血中分布情况

血液中 CIK 细胞分布 ($CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 细胞) 检测结果见图 5~6, 首次给药后 3 h, 高剂量组动物血液中即可检测到 CIK 细胞, 1 d 后细胞水平达高峰, 随后逐渐下降。末次给药前, 高剂量组雄性和雌性动物血液中均可检测到较高水平的 CIK 细胞。末次给药后 3 h, 高剂量

组雄性动物外周血中 CIK 细胞含量略有下降, 给药 1 d 时再次达峰, 随后逐渐下降; 末次给药后 3 h~1 d, 高剂量组雌性动物外周血中 CIK 细胞含量逐渐下降, 给药后 3~10 d 再次达峰, 随后逐渐下降。低剂量组, 仅首次给药后 1 d 和末次给药后个别时间点 (3 h、10 d、29 d) 可检测到少量 CIK 细胞。

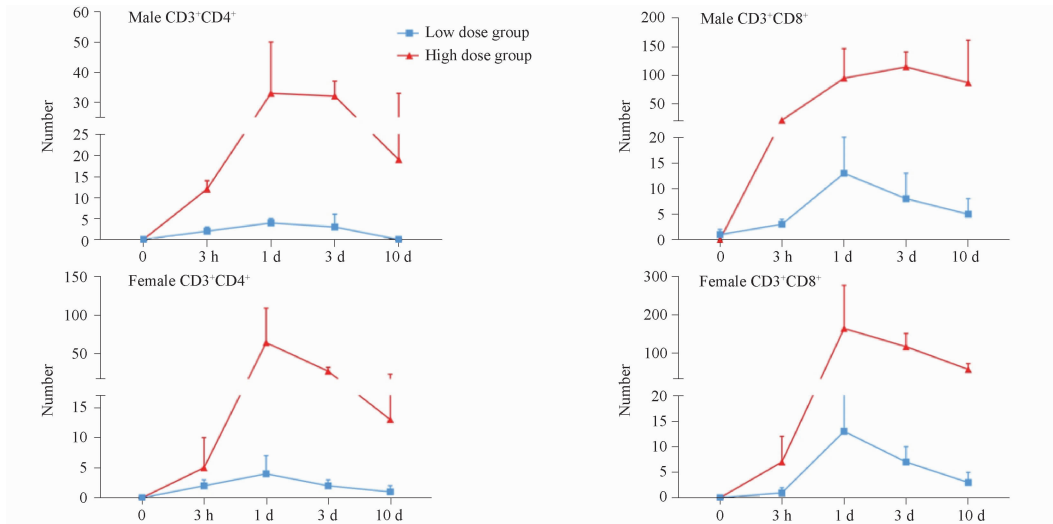


图 5 首次给药前后不同时间点 NPG 小鼠外周血液 $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞数量变化趋势图。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 The change of $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ peripheral blood cells in NPG mice at different time points before and after the first administration. $n = 5, \bar{x} \pm s$

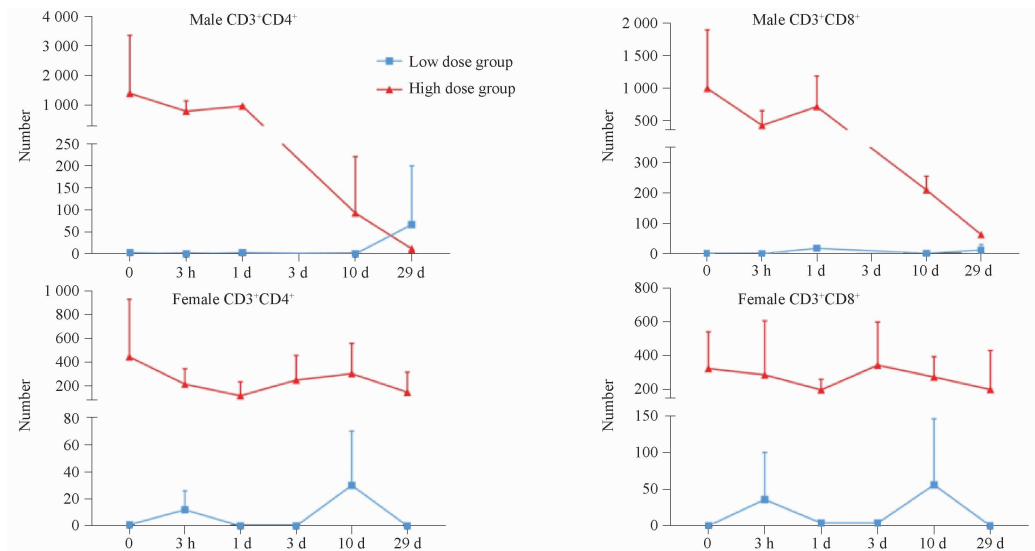


图 6 末次给药前/后不同时间点 NPG 小鼠外周血液 $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞数量变化趋势图。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 The change of $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ peripheral blood cells in NPG mice at different time points before and after the last administration. $n = 5, \bar{x} \pm s$

3.6 细胞因子检测结果

人源细胞因子检测 (图 7): 每只小鼠给予 2×10^6 个 CIK 细胞的剂量下, 对小鼠血清中人源

IFN- γ 、TNF、IL-10、IL-6、IL-4、IL-2 细胞因子水平无显著影响; 在 3×10^7 个 CIK 细胞的剂量下, 可能会使 NPG 小鼠血清中人源因子 IFN- γ 、TNF、IL-10、

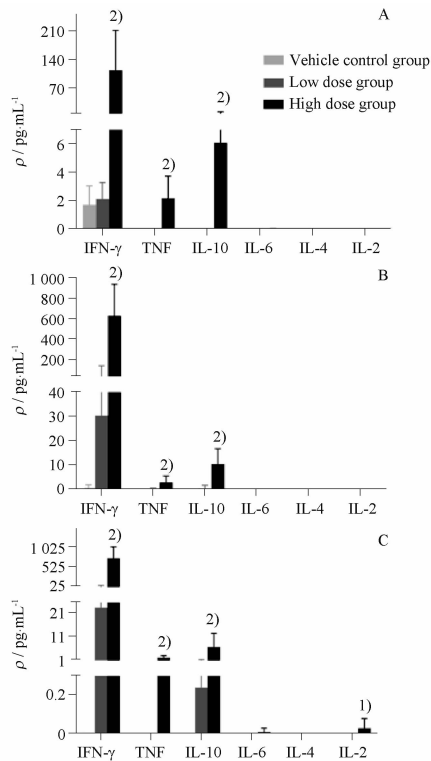


图7 CIK细胞给药后不同时间点NPG小鼠血清中人源细胞因子检测结果。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

A - 首次给药后30 d; B - 末次给药后1 d; C - 恢复期结束; IFN-γ - 干扰素-γ; TNF - 肿瘤坏死因子; IL-10 - 白介素-10; IL-6 - 白介素-6; IL-4 - 白介素-4; IL-2 - 白介素-2; 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

A - 30 d after the first administration; B - 1 d after the last administration; C - end of recovery period; IFN-γ - interferon-γ; TNF - tumor necrosis factor; IL-10 - interleukin-10; IL-6 - interleukin-6; IL-4 - interleukin-4; IL-2 - interleukin-2; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with the vehicle control group.

图7 Detection of human cytokines in serum of NPG mice at different time points after CIK cells administration. $n = 10, \bar{x} \pm s$

IL-2水平显著升高($P < 0.01$), CIK细胞属于人源T淋巴细胞, 结合组织病理学结果分析, 上述细胞因子水平变化可能与CIK细胞体内药效学作用以及CIK细胞(人源细胞)给予小鼠后产生GvHD反应等多种因素相关。

鼠源细胞因子检测(图8): 每只小鼠给予 2×10^6 CIK细胞的剂量下, 对小鼠血清中鼠源IL-10、IL-17A、IFN-γ、TNF、IL-6、IL-4、IL-2细胞因子无显著影响; 在 3×10^7 CIK细胞的剂量下, 可能会使小鼠血清中鼠源因子TNF、IL-6水平升高($P < 0.01$), 考虑这一变化与给予异种细胞后机体产生的免疫应答反应相关。

3.7 病理学检查结果

病理学检查结果见图9, 给予CIK细胞会引起多个组织器官[如肝脏、胆囊、肾脏、肺(含支气管)、

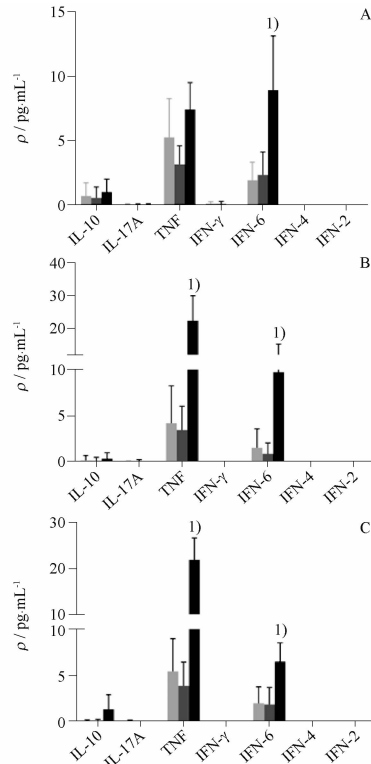


图8 CIK细胞给药后不同时间点NPG小鼠血清中鼠源细胞因子检测结果。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

A - 首次给药后30 d; B - 末次给药后1 d; C - 恢复期结束; IL-17A - 白介素-17A; IFN-6 - 干扰素-6; IFN-4 - 干扰素-4; IFN-2 - 干扰素-2; 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

A - 30 d after the first administration; B - 1 d after the last administration; C - end of recovery period; IFN-γ - interferon-γ; TNF - tumor necrosis factor; IL-10 - interleukin-10; IL-6 - interleukin-6; IL-4 - interleukin-4; IL-2 - interleukin-2; IL-17A - interleukin-17A; IFN-6 - interferon-6; IFN-4 - interferon-4; IFN-2 - interferon-2; ¹⁾ $P < 0.01$, compared with the vehicle control group.

图8 The results of determination of mouse-derived cytokines in serum of NPG mice at different time points after administration of CIK cells. $n = 10, \bar{x} \pm s$

脾脏、心脏、颌下腺、胃、甲状腺、垂体、食道、舌、气管、胸骨(骨髓)、骨(单侧大腿骨)、睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、卵巢、输卵管、子宫(带子宫颈)、阴道、膀胱、肾上腺、肌肉(骨骼肌)、坐骨神经、皮肤、脑、注射部位]混合细胞聚集; 给予人源CIK细胞后引起的GvHD及继发性病理改变见表3和图10, 包括肝脏肝细胞变性或坏死及纤维化, 脾脏纤维化, 舌基底细胞变性或坏死, 前胃炎性细胞浸润伴基底细胞变性或坏死及基底细胞变性或坏死, 皮肤表皮增生、基底细胞变性或坏死, 颌下腺浆液性腺泡分泌减少, 胸骨(骨髓)和骨(单侧大腿骨)骨髓细胞数目减少、纤维-骨性病变更以及皮肤皮下、脑和脊髓(颈胸腰段)出血。

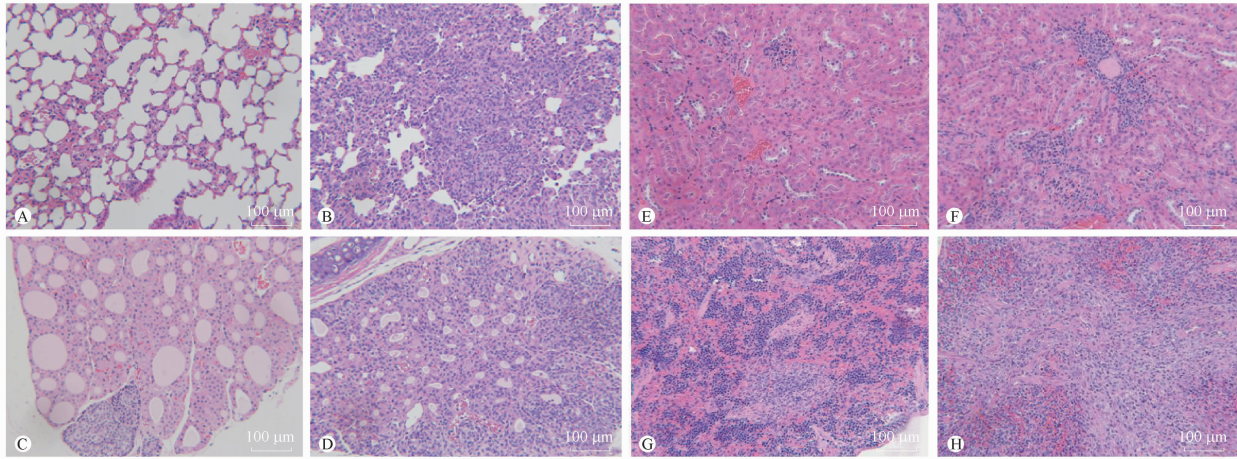


图9 CIK细胞注射后引发的组织病理改变
Fig. 9 Histopathological changes induced by CIK cell injection
 A - lung in vehicle control group; B - lung in high dose group, severe mixed cell aggregation; C - thyroid in vehicle control group; D - thyroid in high dose group, moderate mixed cell aggregation; E - kidney in vehicle control group; F - kidney in high dose group, minimal mixed cell aggregation; G - spleen in vehicle control group; H - spleen in high dose group, mild mixed cell aggregation.

图9 CIK细胞注射后引发的组织病理改变

Fig. 9 Histopathological changes induced by CIK cell injection

表3 给药后NPG小鼠出现与给与CIK相关的移植物抗宿主反应(GvHD)反应

Tab. 3 NPG mice developed GVHD associated with CIK administration

Organ /tissue	Related lesion	Degree of lesion	Frequency of lesion					
			Male			Female		
			Vehicle control group (n=10)	Low dose group (n=10)	High dose group (n=6)	Vehicle control group (n=10)	Low dose group (n=9)	High dose group (n=6)
Spleen	Fibrosis	+	0	0	0	0	0	1
		++	0	0	0	0	0	2
Submandibular gland	Decreased secretion of serous acinar cell	++	0	0	3	0	0	2
		+++	0	0	2	0	0	2
Stomach	Inflammatory cell infiltration in the cardia of the stomach with degeneration/necrosis of basal cells	+	0	0	5	0	0	5
Sternum (bone marrow)	Decreased bone marrow cells	++	0	0	1	0	0	0
Bone (unilateral femur)	Decreased bone marrow cells	+	0	0	0	0	0	1
		++	0	0	2	0	0	0
Skin	Fibro-osseous lesion	+	0	0	1	0	0	0
	Epithelial hyperplasia	+	0	0	4	0	0	2
		++	0	0	1	0	0	4
Skin at the site of dorsal hairloss	Degeneration/necrosis of basal cells	+	0	0	5	0	0	6
	Epithelial hyperplasia	++	-	-	-	-	-	1
	Degeneration/necrosis of basal cells	+	-	-	-	-	-	1

注: + - 极轻度改变; ++ - 轻度改变; +++ - 中度改变; -- 未见大体病变,因此未对该脏器进行组织病理学检查。

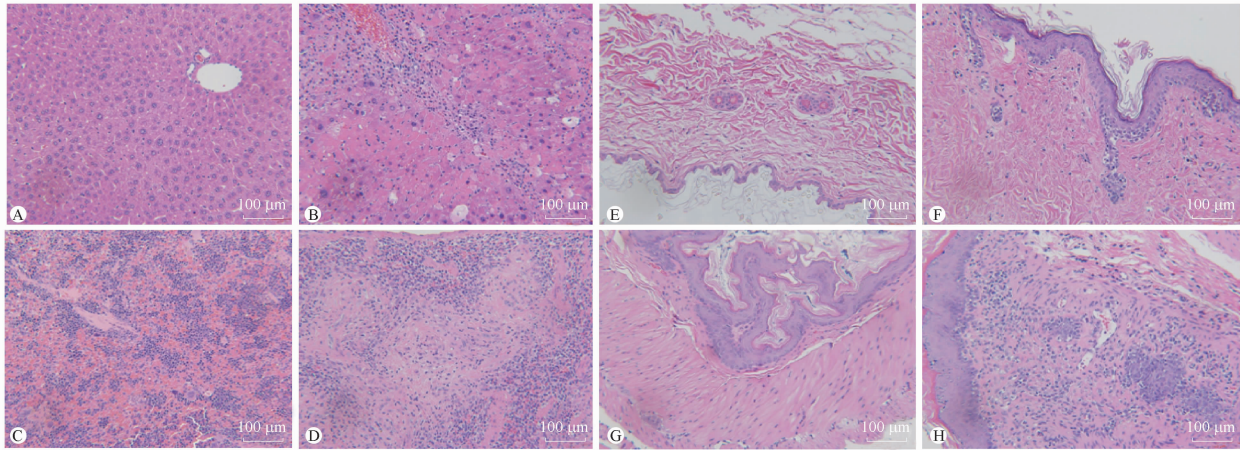
Note: + - A very slight change; ++ - A slight change; +++ - A moderate change; -- No gross lesions were seen and histopathology examination of the organ was not performed.

4 讨论

在非临床研究中,选择合适的动物种属可提高动物试验对于临床不良反应的预测性。本试验采用的NPG小鼠属于重度免疫缺陷小鼠,其体内不含T、B和NK细胞,可降低人源细胞输入引发的免疫排斥反应程度,可用于移植人源细胞或组织,适用于细胞治疗产品的毒性评价^[15]。

在给药剂量方面,本实验研究的CIK细胞注射

液的临床用量主要根据回输细胞量占人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)数的比例推算,因为人拟用剂量 4×10^9 个细胞(约等同于人PBMC数),小鼠每只PBMC数大约是每只 10^6 个细胞,故可据此推算的每只小鼠相当于人临床回输的剂量约 10^6 个细胞,即每千克 5×10^7 个细胞(小鼠体质量按20 g计算)。低剂量组每只小鼠给予 2×10^6 个细胞(约相当于人用剂量的2倍)。



A - 溶媒对照组肝脏; B - 高剂量组肝脏, 轻度混合细胞聚集、中度肝细胞变性或坏死; C - 溶媒对照组脾脏; D - 高剂量组脾脏, 极轻度混合细胞聚集、轻度纤维化; E - 溶媒对照组皮肤; F - 高剂量组皮肤, 轻度表皮增生、极轻度基底细胞变性或坏死; G - 溶媒对照组胃; H - 高剂量组胃、前胃, 极轻度混合细胞聚集, 极轻度炎性细胞浸润伴基底细胞变性或坏死。

A - liver in vehicle control group; B - liver in the high dose group, mild mixed cell aggregation and moderate degeneration or necrosis of hepatocytes; C - spleen in vehicle control group; D - spleen in the high dose group, extremely mild mixed cell aggregation and mild fibrosis; E - skin in vehicle control group; F - skin in the high dose group, mild epidermal hyperplasia, extremely mild basal cell degeneration or necrosis; G - stomach in vehicle control group; H - stomach, fore stomach in the high dose group, extremely mild mixed cell aggregation, extremely mild inflammatory cell infiltration with basal cell degeneration or necrosis.

图 10 CIK 细胞注射后引发的 GvHD 及继发性组织病理改变 (×200)

Fig. 10 GvHD and secondary histopathological changes induced by CIK cell injections (×200)

为尽量观测出 CIK 细胞注射液可能的毒性反应, 按照单次给药毒性试验结果, 本实验采用低剂量的 15 倍, 即每只小鼠给予 3×10^7 个细胞作为给药的高剂量。本 CIK 细胞注射液临床拟用药方案为约间隔 21 d 进行 1 次静脉注射, 最多给药约 6 次 (6 个疗程)。为最大限度模拟临床给药方式, 结合动物实验特点, 本实验采用尾静脉注射的给药方式, 给药频率设为每 2 周 1 次, 给药 10 周, 共给药 6 次, 恢复期设为 28 d (约 1 个月)。

综合动物临床症状、体质量和摄食量结果分析, 低剂量组动物出现弓背、摄食量下降; 高剂量组动物出现弓背、竖毛、脱毛、活动减少、双侧眯眼、头向一侧倾斜、动物体质量和摄食量下降以及死亡等症状。结合组织病理学检查结果, 考虑上述症状与 CIK 细胞注射后在各组织器官的大量滞留并引起 GvHD 反应有关。高剂量组与低剂量组相比, 在实验期间有更多的动物出现了更多样更严重的不良反应, 这表明每只小鼠给予 3×10^7 个细胞的剂量下, CIK 细胞会引起动物明显的 GvHD 反应。

CIK 细胞注射液在低剂量下会引起动物 GLU、CHO 显著升高, 在高剂量下会引起血液学指标中 LYMP%、MONO、MONO%、MPV 显著升高和 BASO、BASO%、RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、PLT 显著降低; 血清生化指标中 GGT、BUN、 Na^+ 、 Cl^- 显著升高、

CK、TBIL、CHO、TP、ALB、A/G、 K^+ 显著降低以及 LDH 和 GLU 的显著改变 (升高/降低), 这是由于在高剂量注射下, CIK 细胞在血液和各器官中的滞留以及小鼠的 GvHD 反应造成的血液与骨髓抑制和脏器病变引起的。

血液中 CIK 细胞数量 (CD3^+ CD4^+ 、 CD3^+ CD8^+) 检测结果显示, CIK 细胞在低剂量和高剂量不同注射条件下, 动物血液中细胞数量差距较大, 在低剂量下, 各类细胞数量始终处于低水平; 在高剂量下, 各类细胞数量显著提升, 但此剂量造成的毒性反应同时也急剧增强, 这表明本实验中 CIK 细胞的两个注射剂量均有一定的局限性, 后续实验仍要继续探索 CIK 细胞的最佳给药剂量。

细胞因子检测结果表明, CIK 细胞注射后会使小鼠血清中的人源细胞因子 IFN- γ 、TNF、IL-10、IL-2 水平升高, 这些细胞因子均参与体内抗肿瘤过程, 证明了该细胞的体内药效学作用。此外, CIK 细胞还会使小鼠血清中鼠源细胞因子 TNF、IL-6 水平显著升高, 这表明给予异种细胞后, NPG 小鼠仍会产生一定的免疫应答。

CIK 细胞注射后可引起动物多脏器重量改变和形态学变化, 病理学检查结果显示, 给予 CIK 细胞注射液引起了小鼠体内多脏器的混合细胞聚集, 其形态学改变体现了 CIK 细胞的药效学作用和毒性

作用过程,建议临床试验时加强关注。由于本研究中所使用的细胞为人源,给予 NPG 小鼠后引发了 GvHD 和一系列继发性病理改变。

GvHD 最早即是在小鼠模型上观察到的^[17],其产生的主要原因是供体 T 细胞识别宿主抗原触发了免疫反应,从而对宿主自身组织和器官进行攻击。临床表现上,GvHD 多发于皮肤、口腔、眼睛、肝脏、胃肠道、肌肉、骨骼、肺、造血系统及泌尿生殖系统等器官和组织^[18]。尽管本试验使用的是重度免疫缺陷小鼠,但在高剂量的异种 CIK 细胞注射下,仍会引发严重的 GvHD 反应,病理学检查结果也可见上述部位的病变。这将在一定程度上影响动物的生存期,缩短毒性试验观察周期,因此免疫缺陷小鼠在异种 CIK 细胞非临床安全性评价中仍然有一定的局限性,有待未来进一步探索和不断完善。有报道使用动物源 CIK 细胞进行小鼠体内试验的结果显示,这种方法制备的细胞不会引起动物的 GvHD^[19]。但是在非临床安全性评价的过程中,动物源 CIK 细胞需要专门制备并详细地提供与人源 CIK 细胞的对比数据以保证质量标准如一,增加了非临床试验的步骤和成本。人源化动物模型需要对动物进行相当复杂的转基因和移植操作^[20],虽然可以使用人源 CIK 细胞进行研究并降低 GvHD 发生的概率,但存在动物模型不稳定等问题,增加了实验的难度。因此,在今后的 CIK 细胞非临床研究中,试验受试物和动物模型的选择仍需要继续探索,完善非临床安全性研究的数据。

综上所述,本研究使用免疫缺陷小鼠全面评估了 CIK 细胞的体内毒性风险,研究结果提示,CIK 细胞在模拟人用剂量的注射条件(每只小鼠给予 2×10^6 个细胞)下重复给药 6 次,不会引起小鼠明显的毒性反应;在每只小鼠给予 3×10^7 个细胞剂量下,小鼠会产生与异种移植相关的 GvHD 反应,未见其他相关的毒理学反应。该研究数据用于支持 CIK 细胞向国家药品监督管理局申报研究性新药申请,并已获准在国内开展临床试验。

REFERENCES

- [1] MESIANO G, TODOROVIC M, GAMMAITONI L, *et al.* Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6):673-684.
- [2] LINN Y C, LAU S K, LIU B H, *et al.* Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell[J]. *Immunology*, 2009, 126(3):423-435.
- [3] PIEVANI A, BORLERI G, PENDE D, *et al.* Dual-functional

capability of CD3⁺ CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity [J]. *Blood*, 2011, 118(12):3301-3310.

- [4] FRANCESCHETTI M, PIEVANI A, BORLERI G, *et al.* Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5):616-628.
- [5] VERNERIS M R. Natural killer cells and regulatory T cells: how to manipulate a graft for optimal GVL[J]. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 2013:335-341.
- [6] CHEN R, DENG X, WU H, *et al.* Combined immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for malignant tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(2):451-464.
- [7] DU H, YANG J, ZHANG Y. Cytokine-induced killer cell/dendritic cell combined with cytokine-induced killer cell immunotherapy for treating advanced gastrointestinal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):357.
- [8] SCHUSSEK S, BERNASCONI V, MATTSSON J, *et al.* The CTA1-DD adjuvant strongly potentiates follicular dendritic cell function and germinal center formation, which results in improved neonatal immunization[J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(3):545-557.
- [9] PIEVANI A, BELUSSI C, KLEIN C, *et al.* Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies[J]. *Blood*, 2011, 117(2):510-518.
- [10] DAI C, LIN F, GENG R, *et al.* Implication of combined PD-L1/PD-1 blockade with cytokine-induced killer cells as a synergistic immunotherapy for gastrointestinal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):10332-10344.
- [11] YANG Z, ZHANG Q, XU K, *et al.* Combined therapy with cytokine-induced killer cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 induce enhanced antitumor activity in liver tumor model[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44802. DOI: 10.1371/journal.pone.0044802.
- [12] INTRONA M. CIK as therapeutic agents against tumors[J]. *J Autoimmun*, 2017, 85:32-44.
- [13] YU S J, MA C, HEINRICH B, *et al.* Targeting the crosstalk between cytokine-induced killer cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3):449-457.
- [14] RUNDQVIST H, VELICA P, BARBIERI L, *et al.* Cytotoxic T-cells mediate exercise-induced reductions in tumor growth[J]. *eLife*, 2020, 9:e59996. DOI:10.7554/eLife.59996.
- [15] WEN H, LOU X, QU Z H, *et al.* Pre-clinical efficacy of CD20-targeted chimeric antigen receptor T cells for non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Discov Oncol*, 2022, 13:122.
- [16] WEN H, HUO G, HOU T, *et al.* Preclinical efficacy and safety evaluation of interleukin-6-knockdown CAR-T cells targeting at CD19[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(23):1713.
- [17] BARNES D W, LOUITT J F. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II [J]. *Br J Haematol*, 1957, 3(3):241-252.
- [18] GHIMIRE S, WEBER D, MAVIN E, *et al.* Pathophysiology of GvHD and other HSCT-related major complications [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(3):79.
- [19] BAKER J, VERNERIS M R, ITO M, *et al.* Expansion of cytolytic CD8⁺ natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production [J]. *Blood*, 2001, 97(10):2923-2931.
- [20] DE LA ROCHERE P, GUIL-LUNA S, DECAUDIN D, *et al.* Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9):748-763.

(收稿日期:2024-06-28)