

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.003

重组鼠 IFN- γ 腺病毒诱发细胞因子释放综合征小鼠模型的建立和观察

杨箐¹, 张玮光¹, 黎陈铖¹, 刘细细¹, 胡中晓¹, 王凤楠¹, 陈碧清², 田芳², 张晓丽¹, 热爱拉·加那提¹, 朱学军³
(1. 南京中医药大学附属医院、南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学附属医院 中心实验室, 江苏 南京 210029; 3. 南京中医药大学附属医院 血液科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:** 通过向 C57Bl/6J 小鼠腹腔注射 IFN- γ 腺病毒 (Ad-mIFN- γ) 建立细胞因子释放综合征 (CRS) 的动物模型。**方法:** 构建 Ad-mIFN- γ 及对照 Ad-lacZ 腺病毒载体, 分别以 MOI=100 体外转染小鼠腹腔巨噬细胞, 流式细胞术检测其对细胞 mIFN- γ 分泌的影响。将 40 只雌性 C57Bl/6J 小鼠按随机数字表法分为对照组、载体对照组、病毒低、中、高剂量组 (每组 8 只), 分别向各组小鼠腹腔注射 PBS (200 μ L)、Ad-lacZ (2×10^7 PFU/只)、Ad-mIFN- γ (5×10^6 PFU/只)、Ad-mIFN- γ (1.5×10^7 PFU/只) 和 Ad-mIFN- γ (2×10^7 PFU/只)。每日观测小鼠的体质量及生存情况; 第 3 天时采用流式细胞术检测小鼠外周血和脾内单核细胞 (CD11b⁺)、巨噬细胞 (CD11b⁺/CD86⁺) 比例, 免疫荧光染色法检测脾内 CD11b⁺ 的单核细胞比例; 第 9 天时采用流式细胞术检测小鼠血清中细胞因子的分泌水平; 第 14 天, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, H-E 染色法观察小鼠肝、脾、肺和肾的病理和组织学变化。**结果:** Ad-mIFN- γ 体外感染小鼠腹腔巨噬细胞, 在第 3 天检测到巨噬细胞分泌 mIFN- γ 达到峰值 (118.34 $\pm$ 2.90) pg/mL, 并在一周内持续高分泌 mIFN- γ , Ad-lacZ 对照组 IFN- γ 分泌水平较低后, 第 3 天时为 (0.17 $\pm$ 0.08) pg/mL。小鼠腹腔注射 Ad-mIFN- γ 后, 在 14 d 内病毒低、中剂量组无小鼠死亡, 病毒高剂量组小鼠体质量持续减轻 ($P < 0.001$); 第 3 天, 病毒高剂量组小鼠外周血和脾组织内单核细胞、巨噬细胞比例较对照组和中剂量组均显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 9 天, 病毒低、中、高剂量组小鼠血清中 mIFN- γ 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、IL-1、TNF- α 等细胞因子的水平均显著升高 ($P < 0.001$); 10 d 内病毒高剂量组小鼠死亡率达 100%。组织病理检测可见病毒高剂量组小鼠的肝、脾、肺、肾组织有明显损伤。**结论:** Ad-mIFN- γ 体外感染小鼠原代腹腔巨噬细胞后, 可以快速分泌 mIFN- γ ; 腹腔注射高剂量 (2×10^7 PFU/只) Ad-mIFN- γ 导致小鼠出现 CRS 典型表现, 可作为 CAR-T 细胞治疗诱发 CRS 的动物模型。

[关键词] γ -干扰素; 腺病毒; 巨噬细胞; 细胞因子释放综合征; 动物模型; C57Bl/6J 小鼠

[中图分类号] R730.51; R73-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)02-0128-07

Establishment and observation of a mouse model of cytokine release syndrome induced by recombinant mouse IFN- γ adenovirus

YANG Jing¹, ZHANG Weiguang¹, LI Chencheng¹, LIU Xixi¹, HU Zhongxiao¹, WANG Fengnan¹, Chen Biqing², TIAN Fang², ZHANG Xiaoli¹, JIANATI Reaila¹, ZHU Xuejun³ (1. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 3. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an animal model of cytokine release syndrome (CRS) by intraperitoneal injection of mouse IFN- γ adenovirus (Ad-mIFN- γ) into C57Bl/6J mice. **Methods:** Ad-mIFN- γ and Ad-LacZ control adenoviral vectors were constructed, and mouse peritoneal macrophages were transfected with MOI=100 *in vitro*. The effect on mIFN- γ secretion levels of cells were detected by flow cytometry. Forty female C57Bl/6J mice were divided into the control group, the vector control group, and the low-, medium-, and high-dose virus groups (8 mice in each group) according to the random number table method. The mice were intraperitoneally injected with PBS (200 μ L/piece), Ad-lacZ (2×10^7 PFU/piece), Ad-mIFN- γ (5×10^6 PFU/piece), Ad-mIFN- γ (1.5×10^7 PFU/piece) and Ad-mIFN- γ (2×10^7 PFU/piece), respectively. The body weight and survival of the mice were observed daily. On the third day, flow cytometry was used to detect the proportion of monocytes (CD11b⁺) and macrophages (CD11b⁺/CD86⁺) in the peripheral blood and the spleen, and the

[基金项目] 国家自然科学基金 (No. 82001206); 江苏省中医药科技发展计划 (No. ZT202106); 江苏省中医院高峰学术人才培养工程 (No. y2021rc42); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (No. KYCX23_2122); 医学免疫学国家重点实验室开放课题 (No. NKMI2021K18)

[作者简介] 杨箐 (1999—), 女, 硕士生, 主要从事中药药理学活性的研究。E-mail: 3032209337@qq.com

[通信作者] 朱学军, E-mail: zhuxuejun@njucm.edu.cn; 陈碧清, E-mail: chenbiqing333@163.com

proportion of CD11b⁺ monocytes in the spleen was detected by immunofluorescence staining. On the 9th day, flow cytometry was used to detect the secretion of cytokines in the serum of the mice. On the 14th day, the mice were sacrificed by cervical dislocation, and H-E staining was used to observe the pathological and histological changes of the liver, spleen, lungs and kidneys of the mice. **Results:** Ad-mIFN- γ infected mouse peritoneal macrophages *in vitro*, and the level of mIFN- γ secreted by macrophages was detected to reach a peak of (118.34 $\pm$ 2.90) pg/mL on the third day, and the secretion level of mIFN- γ continued to be high for one week; while the Ad-lacZ control group secreted a lower level of IFN- γ , with a value of (0.17 $\pm$ 0.08) pg/mL on the third day. After intraperitoneal injection of Ad-mIFN- γ , no mice died in the low- and medium-dose virus groups within 14 days, and the body weight of the mice in the high-dose virus group continued to decrease ($P<0.001$). On the third day, the proportions of monocytes and macrophages in the peripheral blood and spleen tissues of the mice in the high-dose virus group were significantly higher than those in the control group and the medium-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). On the 9th day, the serum levels of mIFN- γ , IL-6, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), IL-1 and TNF- α in the low-, medium- and high-dose groups increased significantly ($P<0.001$). Within 10 days, the mortality rate of the mice in the high-dose virus group reached 100%. Histopathological examination showed significant damage in the liver, spleen, lung and kidney tissues of the mice in the high-dose virus group. **Conclusion:** Mouse primary peritoneal macrophages can rapidly secrete mIFN- γ after infection with Ad-mIFN- γ *in vitro*. Intraperitoneal injection of high-dose Ad-mIFN- γ (2×10^7 PFU/piece) resulted in typical CRS manifestations in the mice, which can be used as an animal model for CAR-T cell therapy-induced CRS.

[Key words] gamma-interferon (IFN- γ); adenovirus; macrophage; cytokine release syndrome (CRS); animal model; C57Bl/6J mice

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(2): 128-134. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.003]

CAR-T 细胞疗法为肿瘤免疫治疗, 尤其是血液肿瘤的治疗带来了变革性的影响, 但同时也会引发严重的细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)^[1-4]。发生 CRS 是由于 CAR-T 细胞输入人体后会被过度激活并快速增殖, 大量释放 IFN- γ 、IL-1、IL-2 等细胞因子激活单核/巨噬细胞, 导致 IL-6、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 等细胞因子的级联释放^[5-9], 引起患者高烧、低血压、肌痛、凝血障碍、呼吸困难、终末器官障碍等临床表现、甚至导致死亡^[10-14]。建立稳定的 CRS 模型对于寻找 CRS 有效的治疗药物以及控制疾病的发展具有重要意义。目前, 国际上报道过 2 种 CAR-T 相关 CRS 模型^[15-16], 但是这两种动物模型均使用 CAR-T 细胞造模, 难度大、不易重复。以往的研究中, 笔者所在课题组已经成功建立 IL-12-CAR-T 细胞诱发 CRS 的小鼠模型^[17], 但是是通过 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞自分泌高水平 IL-12, 诱导 T 细胞表达 IFN- γ 实现自激活^[18]。这与临床发生的 CRS 有一定差异, 以 IL-12 为中心, 不能较好的模拟 CAR-T 相关的 CRS。因此, 本研究拟通过腹腔注射小鼠 IFN- γ 腺病毒 (Ad-mIFN- γ), 转染腹腔巨噬细胞, 代替过度激活的 CAR-T 细胞, 持续释放高水平 mIFN- γ , 从而诱导小鼠发生严重的 CRS, 建立 CRS 模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级雌性 C57Bl/6J 小鼠、6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [实验动物使用许可证号: SCXK (苏) 2022-0006], 饲养于南京中医药大学附属医院实验动物中心 [实验单位使用许可证编号: SYXK (苏) 2017-0069]。本实验研究

设计获得江苏省中医院伦理委员会批准 (伦理批准号: 2022DW-22-02)。

1.2 主要试剂和仪器

表达小鼠 IFN- γ 基因的重组腺病毒 (Ad-mIFN- γ) 和表达 LacZ 基因的重组腺病毒 (Ad-lacZ) 购自吉凯基因公司, 病毒滴度为 1×10^{10} PFU/mL。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自四季青公司, 流式抗体 FITC-CD86/PE-CD11b 购自 BD Biosciences 公司, 免疫荧光抗体 Anti-CD11b Rabbit pAb 购自武汉赛维尔生物有限公司, 复合微球的流式细胞仪免疫测定试剂盒 [MU Inflamm Panel (13-plex) w/Vbp Multi-Analyte Flow Assay Kit] 购自美国 Biolegend 公司, 包埋机 (JB-P5) 和冻台 (JB-15) 均购自武汉俊杰电子有限公司, 病理切片机 (RM2016) 购自上海徕卡仪器有限公司, 冰冻切片机 (CRYOSTAR NX50) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 正置荧光显微镜 (Eclipse C1) 购自日本尼康公司, Pannoramic MIDI 扫描仪购自 3DHISTECH 公司, Beckman Coulter EPICS XL flow cytometer 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的制备

将 C57Bl/6J 小鼠脱颈椎处死, 固定于解剖板上, 酒精消毒腹部, 将下腹部皮肤剪开一小口, 轻轻分离皮层和腹部肌肉膜, 暴露腹膜。向腹腔内注射 5 mL 提前预冷的 PBS (含 2 mmol/L EDTA 和 1% 胎牛血清)。轻揉腹腔后用注射器收集腹腔内细胞悬液, 移入 15 mL 离心管中, 300 $\times$ g 离心 5 min, 得到细胞沉淀。PBS 洗 3 遍, 获得小鼠巨噬细胞。

1.4 Ad-mIFN- γ 转染小鼠腹腔巨噬细胞

将上述获得的腹腔巨噬细胞用无血清的培养基重悬, 以 1×10^6 个/孔加入 24 孔板, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培

养箱中培养2 h,待细胞贴壁后弃上清液,用PBS洗两遍。以MOI=100加入500 μ L滴度为 1×10^8 PFU的Ad-mIFN- γ ,转染等量Ad-lacZ作为对照,继续培养,每30 min轻摇一次使病毒与细胞充分接触。4 h后吸弃上清液,加入2 mL含有10%FBS的RPMI 1640培养基,继续培养,连续7 d收集培养上清液,按照基于复合微球的流式细胞仪免疫测定试剂盒说明书检测腹腔巨噬细胞分泌mIFN- γ 的水平。

1.5 小鼠CRS模型建立及观察

将Ad-lacZ和Ad-mIFN- γ 用PBS稀释成 1×10^8 PFU/mL,将6~8周龄的C57Bl/6J雌性小鼠按照随机数字表法分为5组,每组8只。对照组:腹腔注射200 μ L PBS;载体对照组:腹腔注射Ad-lacZ(2×10^7 PFU/只);病毒低剂量组:腹腔注射Ad-mIFN- γ (5×10^6 PFU/只);病毒中剂量组:腹腔注射Ad-mIFN- γ (1.5×10^7 PFU/只);病毒高剂量组:腹腔注射Ad-mIFN- γ (2×10^7 PFU/只)。每天观察小鼠的情况,测量体质量,统计生存率。

1.6 流式细胞术检测小鼠外周血和脾中单核/巨噬细胞的活化比例

在注射病毒的第3天,采用摘眼球取血方法,取Ad-lacZ组,Ad-mIFN- γ 中、高剂量组小鼠的外周血。将采集到的外周血移至EDTA抗凝管中,震荡混匀。颈椎脱臼法处死小鼠,取出脾,于40 μ m孔径的尼龙滤网上研磨,用PBS溶液(含2 mmol/L EDTA和1%胎牛血清)冲洗,制备脾单细胞悬液。分别取50 μ L外周血和脾细胞悬液加入到EP管中,向各组样本管加入1 μ L FITC-CD86抗体(0.5 mg/mL)和1 μ L PE-CD11b抗体(0.5 mg/mL),4 $^{\circ}$ C下反应30 min,加入500 μ L红细胞裂解液。同方法取阴性对照组小鼠外周血和脾并处理,但不加入抗体。最后加入1 mL预冷的PBS清洗,4 $^{\circ}$ C下300 $\times$ g离心5 min,弃去上清液,加入400 μ L的缓冲液重悬细胞,装入流式管内行流式细胞术检测。

1.7 免疫荧光染色测定小鼠腹腔注射Ad-mIFN- γ 后脾CD11b的表达情况

小鼠腹腔注射Ad-mIFN- γ 3 d后取脾,用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、制备切片。石蜡切片经脱蜡、抗原修复、血清封闭后加入一抗CD11b(1:500),切片平放于湿盒内4 $^{\circ}$ C反应过夜,清洗后加入二抗CY3(1:300)避光、室温反应50 min,清洗后加DAPI染液,避光、室温反应10 min,复染细胞核。使用抗荧光淬灭剂封片,Pannoramic MIDI扫描仪扫描。

1.8 多重微球流式免疫荧光发光法检测小鼠血清中细胞因子的水平

在第9天通过眼眶后静脉丛采血法取小鼠血液,加入2 mmol/L EDTA抗凝剂混匀,300 $\times$ g离心5 min

取上清液,放置于-80 $^{\circ}$ C保存。采用基于复合微球的流式细胞仪免疫测定试剂盒检测小鼠血清中IL-6、MCP-1、IL-1、IL-10、TNF- α 、mIFN- γ 等细胞因子的水平,本实验所有步骤均根据制造商说明进行。将标准品稀释成不同的浓度用于绘制标准曲线。将基质、标准品/样品、捕获微球抗体、检测抗体各25 μ L充分混合后放入振荡器,避光、室温震荡2 h,加入25 μ L SA-PE避光、震荡30 min,加入500 μ L洗涤缓冲液,涡旋数秒后300 $\times$ g离心5 min,缓慢倾倒出液体后将管倒扣于吸水纸上吸尽残液,向每管中加入150~300 μ L洗涤缓冲液,上流式细胞仪检测。

1.9 H-E染色观察各组小鼠肝、脾、肺、肾组织病理变化

第14天,采用颈椎脱臼法处死小鼠,取肝、脾、肺、肾等组织标本,经4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、连续切片、H-E染色,在光学显微镜下进行病理组织学观察。

1.10 统计学处理

上述主要实验均独立重复3次,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。流式细胞术检测细胞表面抗原结果数据用Kaluza Analysis流式细胞分析软件处理,细胞因子检测数据用Flowjo V10、Biolegend-LEGEND plex软件进行分析处理,其他数据应用GraphPad Prism7软件进行统计分析,两组均数间比较采用 t 检验,两组多时间点比较采用方差分析,两两比较采用LSD- t 检验;以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-mIFN- γ 转染小鼠原代腹腔巨噬细胞可快速分泌IFN- γ

流式细胞术检测结果(图1)显示,与Ad-lacZ组相比,Ad-mIFN- γ 组小鼠腹腔巨噬细胞转染后可以快速、持续分泌mIFN- γ ($P < 0.01$)。Ad-mIFN- γ 组小鼠腹腔巨噬细胞连续7 d高分泌mIFN- γ ,并在第3天达到峰值(120 ± 5.03) pg/mL。

2.2 高剂量Ad-mIFN- γ 可诱发小鼠严重的CRS并致其死亡

注射腺病毒14 d内,病毒低剂量组小鼠体质量无明显变化,无小鼠死亡;病毒中剂量组小鼠体质量连续减轻至第8天后开始回升,无小鼠死亡;病毒高剂量组小鼠出现发抖、精神萎靡、起毛等现象,表现出严重的体质量减轻,最终全部死亡(图2)。

2.3 腹腔注射Ad-mIFN- γ 诱导小鼠外周血和脾单核/巨噬细胞比例升高

流式细胞术检测小鼠外周血及脾单核/巨噬细胞

比例,结果显示,与载体对照组相比,随着 Ad-mIFN- γ 剂量的升高,小鼠外周血和脾组织中的单核细胞(CD11b⁺)、巨噬细胞(CD11b⁺/CD86⁺)比例都显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图3);免疫荧光染色法检测结果可见小鼠脾组织中CD11b的表达随病毒剂量升高而有增加趋势(图4)。

2.4 Ad-mIFN- γ 显著升高小鼠血清中细胞因子水平
流式细胞术检测结果(图5)显示,腹腔注射后第9天,与对照组和载体对照组相比,病毒低、中、高剂量组小鼠血清中 mIFN- γ 、IL-6、MCP-1、IL-1、TNF- α 等细胞因子的水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$),且呈病毒剂量依赖性。

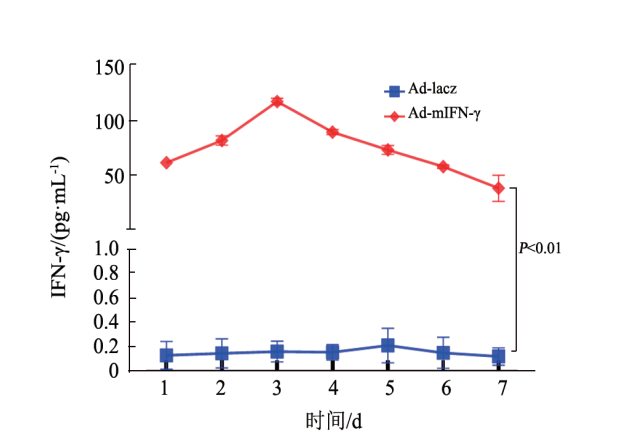
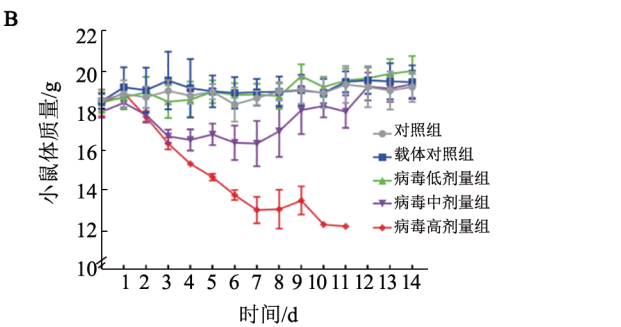
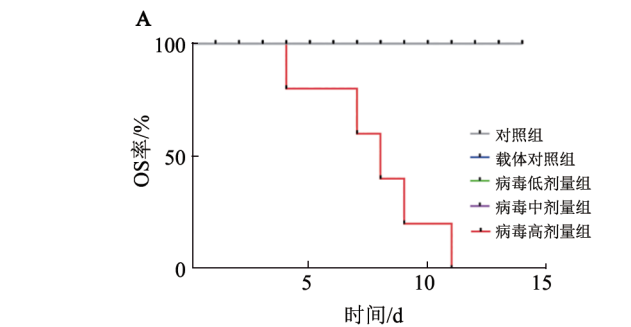


图1 小鼠腹腔巨噬细胞转染 Ad-mIFN- γ 和 Ad-lacZ 后分泌 mIFN- γ 水平比较



A: 各组小鼠生存曲线; B: 注射病毒 14 d 内各组小鼠体质量变化。
图2 腹腔注射 2×10^7 PFU/只 Ad-mIFN- γ 诱发小鼠 CRS

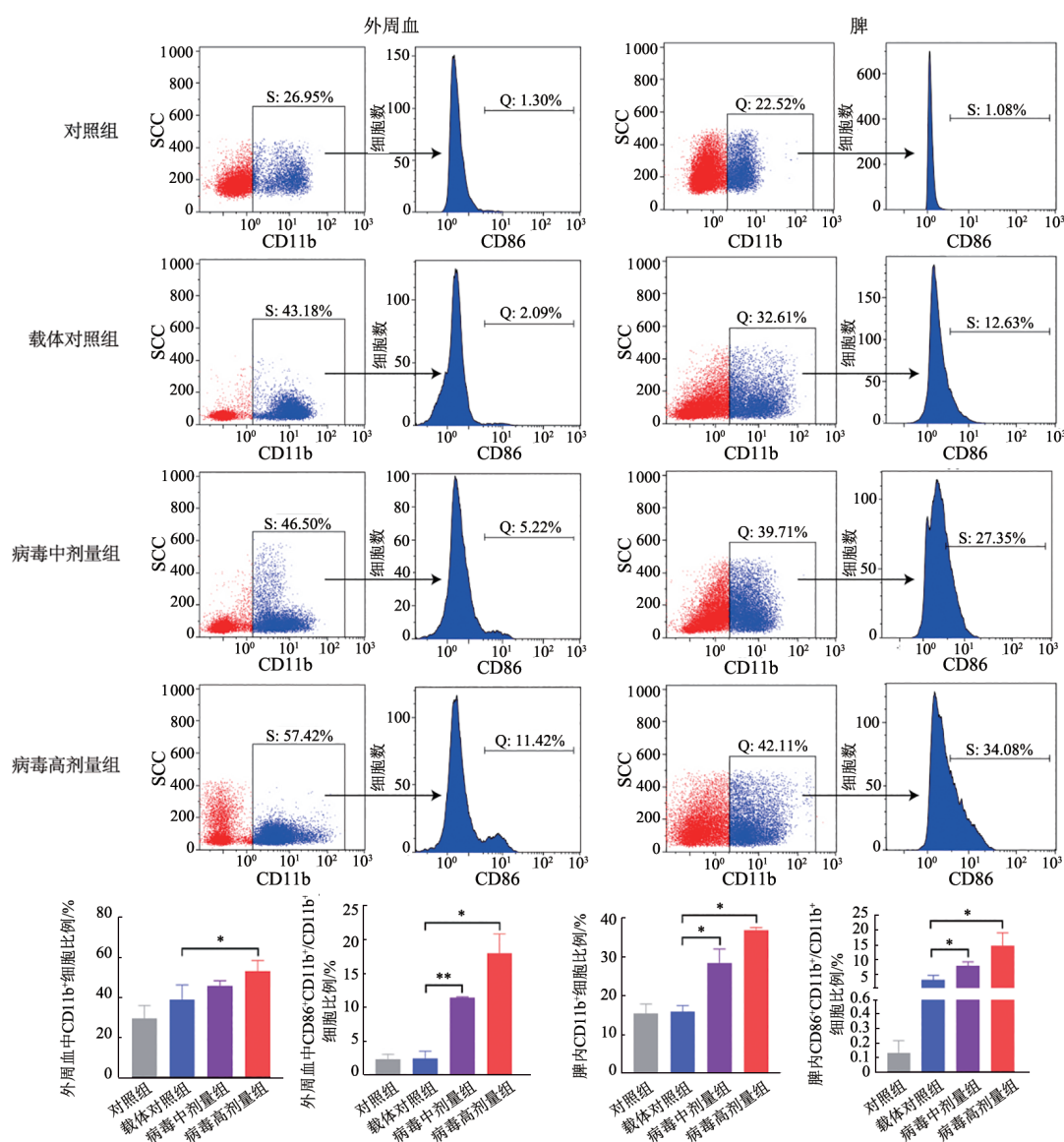
2.5 高剂量的 Ad-mIFN- γ 导致小鼠肝、脾、肺、肾组织损伤

H-E 染色结果(图6)显示:(1)当腹腔注射低剂量病毒时,小鼠肝组织可见少量静脉周围的肝细胞点状坏死,伴有极少量的淋巴细胞浸润,间质无明显增生,可见少量血管淤血;脾白髓内可见凋亡的淋巴细胞,白髓与红髓的分界不清晰;肺组织多见肺泡壁轻度增厚;肾组织间质无明显增生,可见少量血管淤血。(2)当注射中剂量病毒时,肝组织少量汇管区可见淋巴细胞浸润,成纤维细胞轻微增多;肺组织伴有散在的粒细胞或淋巴细胞浸润,支气管黏膜上皮细胞脱落;脾组织的白髓形状不规则,少量白髓边缘互相融合,分界不清晰,白髓内多见凋亡的淋巴细胞;肾组织可见肾小管轻度扩张,管腔不规则,少量肾小管上皮细胞变性,胞质疏松淡染。(3)当注射高剂量病毒时,肝组织结构异常,肝细胞结构疏松,可见部分肝细胞水肿,水肿至气球样变,组织可见淋巴细胞浸润;肺组织整体结构异常,肺泡结构不清晰,可见较多肺泡萎缩塌陷,肺泡壁明显增厚,轻微实质化,组织间质可见血管轻微充血扩张,组织可见炎症细胞浸润;脾组织整体结构异常,组织可见脾小结明显萎缩,可见明显多核巨细胞浸润;肾组织整体结构异

常,组织可见少量肾小管上皮细胞疏松水肿,组织间质可见淤血。

3 讨论

本研究通过腹腔注射 Ad-mIFN- γ 诱发小鼠 CRS, 建立一种新的 CRS 动物模型。研究结果发现,在注射低剂量病毒时,体质量无明显变化,无小鼠死亡,外周血及脾单核/巨噬细胞相较于对照组无明显变化,细胞因子升高不明显,表明未能诱发小鼠 CRS; 当注射中剂量病毒时,体质量下降到第8天后开始回升,无小鼠死亡,第3天可见小鼠外周血和脾单核/巨噬细胞比例增加,第9天检测外周血细胞因子水平发现水平升高,说明中剂量的病毒可诱发小鼠一定级别的细胞因子风暴,但不至于死亡。当注射高剂量病毒时,小鼠体质量持续降低,10 d 内全部死亡,第3天检测外周血和脾单核/巨噬细胞比例发现显著升高,第9天检测细胞因子水平发现显著增加,组织病理检查可见肝、脾、肺组织明显损伤,符合 CRS 的典型表现,说明腹腔注射高剂量 Ad-mIFN- γ 可模拟严重的 CRS 反应。相较于以往的 CRS 小鼠模型,本模型使用的是普通品系的 C57Bl/6J 小鼠,经济、易于获得,建模周期短、可重复性高。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns 代表差异无统计学意义。

图3 腹腔注射 Ad-mIFN- γ 诱导小鼠外周血和脾内单核/巨噬细胞比例升高

以往研究^[15-16]已经证实,巨噬细胞和单核细胞是产生细胞因子的直接介质,而 IFN- γ 是巨噬细胞强有力的活化因子^[19]。过量 IFN- γ 可能会导致高炎症或免疫介导疾病^[20],包括 CRS^[21]。因此,本研究设计在小鼠体内持续表达 IFN- γ 以激活单核/巨噬细胞。然而,巨噬细胞属于分裂终末细胞^[22],逆转录难以进行基因转染。腺病毒既能感染分裂细胞,又能感染非分裂细胞,且易于大量培养^[23-24],并且与慢病毒相比,腺病毒有价格低廉、不会整合到宿主细胞基因组中的优点^[25-26],因此本研究选用腺病毒为载体来实现体内过表达 IFN- γ 。但本研究仅采用腹腔注射来实现体内 IFN- γ 升高,主要激活的是腹腔巨噬细胞,进入体循

环的腺病毒有限,因而对单核细胞及其余器官的巨噬细胞的激活作用较弱,这可能是高剂量腺病毒才能诱导出 CRS 的原因之一。后续研究中会分离小鼠脾 T 细胞,用 IFN- γ 腺病毒转染 T 细胞后通过尾静脉回输进入小鼠体内,从而激活全身的单核/巨噬细胞,释放大量的细胞因子来诱导 CRS。这种方法应能更好地模拟人体输注 CAR-T 细胞以后发生 CRS 的过程。

综上所述,本实验研究报道了一种经济易获得且能较好模拟 CAR-T 细胞治疗相关 CRS 反应机制的小鼠模型的建立方法,为探索触发 CRS 相关免疫功能障碍的机制提供了一种新工具。

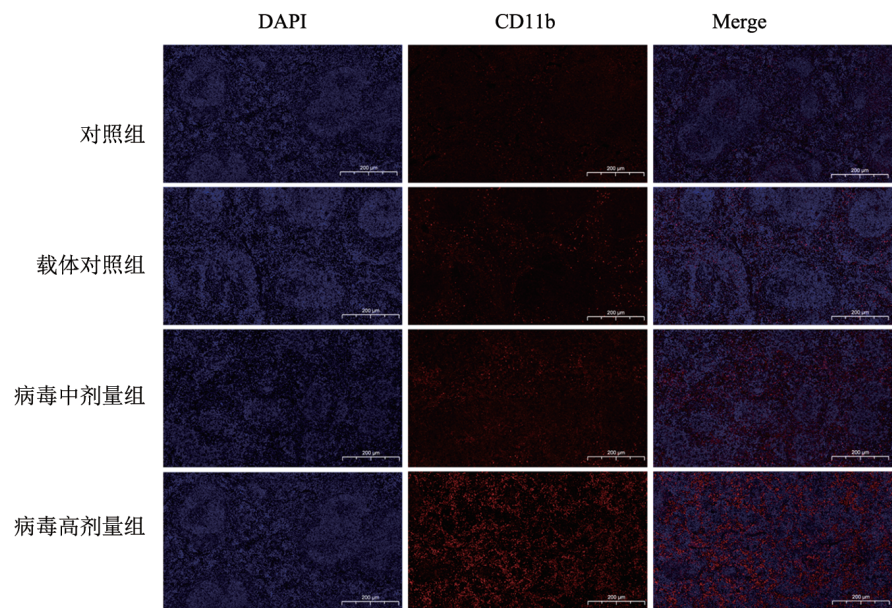


图4 腹腔注射 Ad-mIFN- γ 诱导小鼠脾组织中 CD11b 表达增加 (免疫荧光染色, $\times 200$)

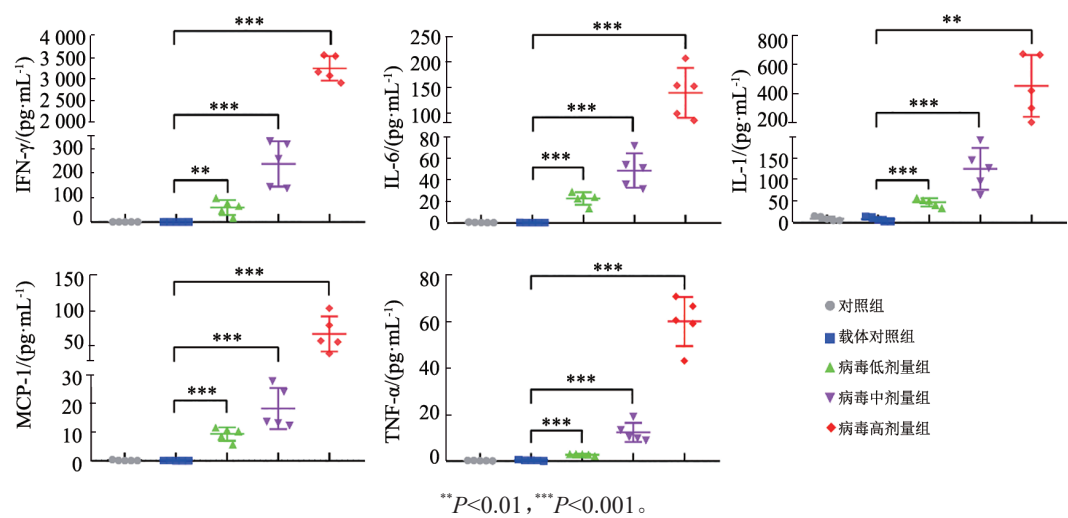


图5 腹腔注射 Ad-mIFN- γ 后小鼠血清中细胞因子水平显著升高

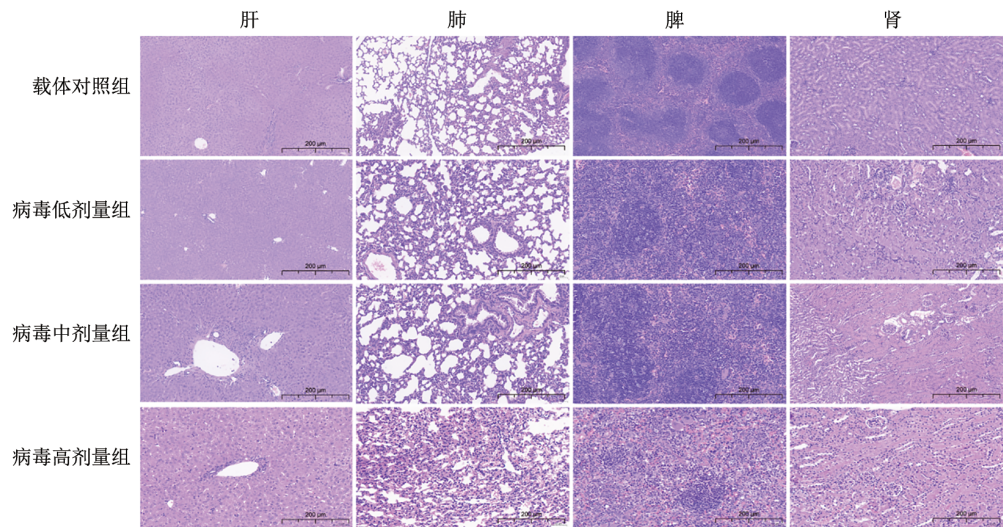


图6 腹腔注射 Ad-mIFN- γ 后小鼠肝、肺、脾、肾病理组织学改变 (H-E 染色, $\times 200$)

[参考文献]

- [1] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR OU, *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359 (6382): 1361-1365. DOI:10.1126/science.aar6711.
- [2] FREY N V, GILL S, HEXNER E O, *et al.* Long-term outcomes from a randomized dose optimization study of chimeric antigen receptor modified T cells in relapsed chronic lymphocytic leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(25): 2862-2871. DOI: 10.1200/JCO.19.03237.
- [3] FISCHER J W, BHATTARAI N. CAR-T cell therapy: mechanism, management, and mitigation of inflammatory toxicities[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 693016[2023-09-05]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.693016>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.693016.
- [4] MIAO L L, ZHANG Z C, REN Z J, *et al.* Reactions related to CAR-T cell therapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 663201[2023-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8113953/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.663201.
- [5] WANG M, MUNOZ J, GOY A, *et al.* KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma[J/OL]. *N Engl J Med*, 2020, 382(14): 1331-1342[2023-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7731441/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1914347.
- [6] SCHUBERT M L, SCHMITT M, WANG L, *et al.* Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(1): 34-48. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.478.
- [7] XIAO X Y, HUANG S K, CHEN S F, *et al.* Mechanisms of cytokine release syndrome and neurotoxicity of CAR T-cell therapy and associated prevention and management strategies[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 367[2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34794490/>. DOI: 10.1186/s13046-021-02148-6.
- [8] SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, GÖDEL P, SUBKLEWE M, *et al.* Cytokine release syndrome[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 56 [2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29907163/>. DOI: 10.1186/s40425-018-0343-9.
- [9] KARKI R, KANNEGANTI T D. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects[J/OL]. *Trends Immunol*, 2021, 42(8): 681-705[2023-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9310545/>. DOI: 10.1016/j.it.2021.06.001.
- [10] BAKER D J, ARANY Z, BAUR J A, *et al.* CAR T therapy beyond cancer: the evolution of a living drug[J]. *Nature*, 2023, 619: 707-715. DOI: 10.1038/s41586-023-06243-w.
- [11] LU J R, JIANG G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 194[2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36209106/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01663-0.
- [12] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, *et al.* CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359 (6382): 1361-1365. DOI: 10.1126/science.aar6711.
- [13] PORTER D, FREY N, WOOD P A, *et al.* Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 35[2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499750/>. DOI: 10.1186/s13045-018-0571-y.
- [14] NEELAPU S S, TUMMALA S, KEBRIAEI P, *et al.* Toxicity management after chimeric antigen receptor T cell therapy: one size does not fit 'ALL'[J/OL]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 218 [2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29434334/>. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.20.
- [15] GIAVRIDIS T, VAN DER STEGEN S J C, EYQUEM J, *et al.* CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade[J]. *Nat Med*, 2018, 24 (6): 731-738. DOI: 10.1038/s41591-018-0041-7.
- [16] NORELLI M, CAMISA B, BARBIERA G, *et al.* Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells[J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-748. DOI: 10.1038/s41591-018-0036-4.
- [17] 黎陈铨, 刘细细, 陈碧清, 等. IL-12-CAR-T细胞诱发细胞因子释放综合征小鼠模型的建立及观察[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(1): 28-34. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.004.
- [18] GOCHER A M, WORKMAN C J, VIGNALI D A A. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment?[J/OL]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(3): 158-172[2023-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8688586/>. DOI: 10.1038/s41577-021-00566-3.
- [19] ZHANG H H, LV X F, KONG Q F, *et al.* IL-6/IFN- γ double knockdown CAR-T cells reduce the release of multiple cytokines from PBMCs *in vitro*[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2022, 18(1): 1-14. DOI: 10.1080/21645515.2021.2016005.
- [20] DE BENEDETTI F, PRENCIPE G, BRACAGLIA C, *et al.* Targeting interferon- γ in hyperinflammation: opportunities and challenges[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(11): 678-691. DOI: 10.1038/s41584-021-00694-z.
- [21] HENDERSON L A, CANNA S W, SCHULERT G S, *et al.* On the alert for cytokine storm: immunopathology in COVID-19[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(7): 1059-1063. DOI: 10.1002/art.41285.
- [22] VAROL C, MILDNER A, JUNG S. Macrophages: development and tissue specialization[J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 643-675. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
- [23] LI X, LE Y, ZHANG Z, *et al.* Viral vector-based gene therapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7736 [2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37175441/>. DOI: 10.3390/ijms24097736.
- [24] SATO-DAHLMAN M, LAROCCA C J, YANAGIBA C, *et al.* Adenovirus and immunotherapy: advancing cancer treatment by combination[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1295[2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32455560/>. DOI: 10.3390/cancers12051295.
- [25] CRYSTAL R G. Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector[J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(1): 3-11. DOI: 10.1089/hum.2013.2527.
- [26] WANG S, LIANG B, WANG W Q, *et al.* Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 149[2023-09-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37029123/>. DOI: 10.1038/s41392-023-01408-5.

[收稿日期] 2023-09-06

[修回日期] 2024-01-13

[本文编辑] 黄静怡