

TJU103对小鼠同种异基因造血干细胞移植模型GVHD的预防作用

移植物抗宿主病(GVHD)是异基因造血干细胞移植的主要并发症及死亡原因之一[1]。动物实验和临床初步实践证明,选择性去除CD4⁺ T细胞或阻断CD4⁺ T细胞活化可以有效降低GVHD的发生[2][3]。小分子有机化合物TJU103可阻断CD4/MHC II相互作用,抑制CD4⁺ T细胞活化[4],但TJU103是否能降低GVHD的发生,目前尚未见报道。本实验研究TJU103对GVHD的影响,旨在探索降低GVHD的新途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物

供体鼠,近交系C57BL/6(H-2 Kb, ♂),8周龄,购自中山医科大学动物实验中心;受体鼠,近交系BALB/c(H-2 Kd, ♀),8周龄,及清洁级CB6F1(H-2 K d/b, ♀),8周龄,均由南方医科大学实验动物中心提供。受鼠饲养在层流架中带盖鼠笼中,鼠笼经过1:10000高氯净浸泡消毒,每周更换2次,饲料及饮水均经消毒。

1.2 主要试剂

TJU103(MERCK公司),RPMI 1640培养基(Gibco公司),新生小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),淋巴细胞分离液(Sigma公司)。

1.3 方法

1.3.1 3H TdR掺入法测定TJU103对单向混合淋巴细胞反应中C57BL/6小鼠淋巴细胞增殖效应的影响[5]

1.3.1.1 刺激细胞及反应细胞的制备 无菌操作下取BALB/c鼠脾脏,剪碎后置于200目金属网上滴加D-Hank's液研磨过滤,制成脾细胞悬液,用含20%小牛血清的RPMI 1640培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$;按终浓度 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加入丝裂毒素(Mit C),在 37°C 、5%CO₂孵箱中孵育30 min后,RPMI 1640培养液洗涤3次,除去残余的Mit C,作为刺激细胞备用;同法制备C57BL/6鼠脾细胞悬液,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,作为反应细胞备用。

1.3.1.2 实验分组 实验组加入刺激细胞 $100 \mu\text{l}$ 及反应细胞 $100 \mu\text{l}$,并按终浓度 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加入TJU103;单纯刺激细胞组只加入刺激细胞 $100 \mu\text{l}$ 及RPMI 1640培养液 $100 \mu\text{l}$;单纯反应细胞组加入反应细胞 $100 \mu\text{l}$ 及RPMI 1640培养液 $100 \mu\text{l}$;对照组加入刺激细胞 $100 \mu\text{l}$ 和反应细胞 $100 \mu\text{l}$ (每组均设3个复孔)。于 37°C 、5%CO₂孵箱中培养5 d后,加入3H-TdR($37 \text{ kBq}/\text{孔}$),继续培养16 h。用细胞收获仪将各组细胞收集在玻璃纤维滤纸上,双蒸水洗去游离的3H-TdR后,放入 80°C 烤箱中烘干。用液体闪烁计数器测滤纸片每分钟脉冲数。按如下公式计算配对刺激指数(RRI):

$$\text{RRI} = \frac{\text{实验孔 cpm} - \text{单纯反应细胞孔 cpm}}{\text{对照孔 cpm} - \text{单纯反应细胞孔 cpm}} \times 100\%$$

1.3.2 利用小鼠同种异基因造血干细胞移植模型检测TJU103对GVHD发生的作用

1.3.2.1 异基因骨髓移植程序 取7 d前开始饮用含红霉素和庆大霉素的清洁级雌性BALB/c鼠及雌性CB6F1鼠分别作为完全异基因骨髓移植及半相合骨髓移植受鼠,于手术日受鼠给予 $60\text{Co}\gamma$ 射线全身照射(TBI)

9.0 Gy, 剂量率为0.5 Gy/min。照射后6 h内经鼠尾静脉接受雄性供鼠C57BL/6的骨髓及脾细胞悬液输入, 进行转基因骨髓移植。

1.3.2.2 供鼠骨髓及脾细胞的制备 无菌条件下采集C57BL/6小鼠股骨和胫骨, 剪开骨骺端, 用注射器吸取RPMI 1640培养液反复冲洗骨髓腔制成细胞悬液, 过4号针头使之成为单细胞悬液, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 备用; 脾脏按200目筛网研磨成单个细胞, 0.83% NH₄Cl溶解红细胞, 调整细胞浓度如下: 骨髓细胞 3×10^7 , 脾细胞 2×10^8 /ml。将骨髓细胞悬液和脾细胞悬液等体积混合, 混合悬液中骨髓细胞和脾细胞最终浓度分别为 1.5×10^7 /ml和 1×10^8 /ml。

1.3.2.3 实验分组 BALB/c受鼠及CB6F1受鼠根据移植物不同随机分为3组, 每组受鼠10只。其中单纯照射组即照射后不进行细胞移植; 对照组受鼠照射后4 h, 经尾静脉注射0.3 ml脾、骨髓细胞混合液, 但不进行其他治疗处理; 在待移植的脾、骨髓细胞悬液中按终浓度25 μ g/ml加入TJU103, 共孵1 h后经尾静脉注入实验组受鼠, 此后受鼠每日腹腔注射TJU103 1次, 剂量为50 μ g, 共7 d。

1.3.2.4 GVHD的监测 (1)大体观察: 体质量变化、体位改变、活动能力、脱毛、大小便; (2)病理检查: 出现GVHD表现的小鼠, 濒死前活杀, 取其肝、脾、小肠和皮肤标本, 以10%甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、切片, HE染色, 光镜下观察。GVHD的判断标准: 外周血白细胞计数 $>1 \times 10^9$ /L, 且伴有食欲下降, 体质量下降, 皱毛, 弓背, 嗜睡或活动减少, 脱毛, 腹泻, 出血或粘膜炎症等表现。病理检查可见肝、肠、皮肤等组织淋巴细胞浸润, 正常组织结构破坏, 伴有局灶性出血等改变。生存期检测: 观察小鼠生存期, 生存期大于30 d, 体质量、饮食、活动正常为长期生存。

1.3.2.5 嵌合体检测 取长期存活的BALB/c、CB6F1鼠各2只, 按5 μ g/kg腹腔注射秋水仙素; 5 h后用眼球摘除法收集约0.5 ml外周血(肝素抗凝), 置于离心管中; 加入经37 $^{\circ}$ C预温的0.075 mol/L氯化钾溶液6 ml, 混匀后静置10 min后离心(1000 r/min、8 min); 滴加新鲜配制的固定液(甲醇3份: 冰醋酸1份)4.5 ml固定30 min, 1000 r/min离心10 min后弃去上清液; 重复两次后加入适量固定液, 制成细胞悬液; 在载玻片上滴加2~3滴细胞悬液, 空气中自然干燥。在Nikon-E600显微镜下观察, 计数Y染色体嵌合比例; 在染色体核型自动分析系统Macktype 5.44上排列分析染色体核型。

1.4 统计学处理

用SPSS10.0软件包处理, 对小鼠生存期进行Wilcoxon秩和检验, 对30 d生存率进行 χ^2 检验, 并绘制生存时间曲线。

2 结果

2.1 TJU103对混合淋巴细胞培养增殖效应的影响

TJU103可明显抑制异体混合淋巴细胞培养的增殖效应, 在25 μ g/ml浓度时, 经5 d共孵TJU103抑制了约83%细胞增殖反应(RRI=17.4%)。

2.2 单纯照射后的结局

照射后体质量进行性下降, 伴活动减少, 皱毛, 弓背但无腹泻, 肛门红肿。照射后第1、2、3天体质量下降最快, 平均每天下降2 g左右, 此后体质量下降趋势有所减缓, 至第6天开始有小鼠死亡, 第10天单纯照射组小鼠全部死亡。死亡时外周血白细胞计数在 $(0 \sim 2) \times 10^6$ /L之间。单纯照射组小鼠不能恢复自身造血, 在2周内100%死亡, 说明预处理方案为清髓性预处理。

2.3 GVHD的发生情况

2.3.1 对照组 第1周体质量变化趋势与单纯照射组类似, 第8~12天体质量略有回升, 但移植后第12天后体质量再度开始下降, 并伴有皱毛、弓背、脱毛、腹泻及肛门红肿, 皮肤增厚等症。移植后12 d开始有小鼠死亡, 至移植后3周小鼠全部死亡, 死亡时平均体质量下降10 g左右。病理学检查可见肝、脾萎缩, 正常组织结构被破坏, 肝、小肠等器官淋巴细胞浸润明显(图1), 皮肤增厚, 角化不良。GVHD发生率及相关死亡率分别为10/10和10/10。

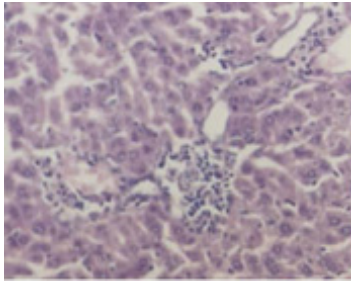


图1 对照组GVHD阳性小鼠肝脏病理切片
Fig.1 Liver tissue of GVHD-positive mice in the control group(HE, original magnification: $\times 200$)

2.3.2 C57BL/6 \rightarrow BALB/c完全异基因移植实验组

平均体质量变化在移植后前12 d与对照组类似,但此后继续保持缓慢上升趋势。本组1只小鼠于移植后20 d出现脱毛、腹泻等症状,并于移植后第25天死亡。另1只小鼠于第23天出现GVHD症状,第27天死亡。其余8只小鼠于观察期(30 d)内未出现明显GVHD症状, GVHD发生率为2/10, 30天生存率为8/10。病理学检查结果见图2。

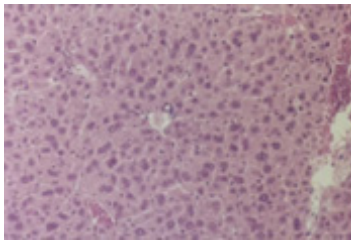


图2 实验组GVHD阴性小鼠肝脏病理切片
Fig.2 Liver tissue of GVHD-negative mice in the experiment group(HE, original magnification: $\times 200$)

2.3.3 C57BL/6 \rightarrow CB6F1半相合移植实验组 结果与C57BL/6 \rightarrow BALB/c移植组基本相似, GVHD发生率为1/10, 30 d生存率为9/10, 其中1只于移植后第24天死于GVHD。

2.4 嵌合体检测

完全异基因移植实验组受测的两只BALB/c鼠外周血单个核细胞Y染色体阳性率分别为18/20和19/20; 半相合移植实验组受测的两只CB6F1小鼠Y染色体阳性率分别为18/20和18/20, 表明结果清髓性预处理后TJU103实验组长期存活小鼠形成完全供者型嵌合体。

3 讨论

GVHD是供者来源的T细胞识别受者的异体抗原(包括主要组织相容性抗原和次要组织相容性抗原,即MHC和MiHC),从而被激活,通过释放细胞因子和直接杀伤等途径引起受者多脏器损伤的免疫病理过程,是造血干细胞移植的主要并发症之一,在异基因干细胞移植的发生率高达30%~70%,并造成约1/3的移植相关死亡率,严重制约了干细胞移植的广泛开展。介导GVHD的主要效应细胞是移植物中的供者源T细胞。去除移植物中的T细胞虽可降低GVHD,但同时增加了感染、移植失败、白血病复发的机会,患者长期生存率并无改善[6],这是因为移植物中的T细胞除参与GVHD外,还具有抗感染、促进植入、抗白血病等效应,去除移植物中的T细胞在降低GVHD同时亦消除了上述三方面的积极作用。选择性去除T细胞的某一亚群如CD4⁺亚群(Th细胞)或CD8⁺亚群(Tc细胞),打破CD4⁺与CD8⁺间的协同作用,可使GVHD的发生率大大降低。Gallardo等[3]采用去除CD4⁺T细

胞的策略进行骨髓移植,收到满意结果,全部12名慢粒患者接受移植后无移植排斥发生,3年生存率达到81.8%,III~IV级GVHD发生率为16.6%,但缺点是在较长时间内,受者CD4⁺和CD8⁺ T细胞比例倒置,影响受者免疫重建。故不去除CD4⁺ T细胞,而用药物来阻断CD4⁺ T细胞活化是目前防治GVHD的一个研究热点。CD4分子在CD4⁺ T细胞的活化中发挥重要作用。阻断CD4与MHC II的相互作用,可抑制CD4⁺ T细胞的活化。目前在动物实验中用于防治GVHD的CD4/MHC II阻断剂包括:rD-mPGPptide、802-2等,均取得了较为满意的效果[7][8]。但阻断人类CD4/MHC II相互作用的多肽在临床前实践中效果并不理想,主要原因是分子量较大、结构不稳定、有一定的抗原性。

TJU103化学名为咪唑亚甲基异烟胺,属小分子非多肽有机化合物。Edling等[4]的研究发现TJU103可与人类CD4分子特异性结合,阻断CD4/MHC II相互作用,可以:(1)阻断CD4⁺ T细胞活化;(2)抑制异体反应性T细胞增殖;(3)治疗实验性变态反应性脑脊髓膜炎;(4)延长皮肤移植存留时间;(5)不影响淋巴结和脾脏中的淋巴细胞及其亚群比例;(6)体内未发现有毒性反应。上述结果表明,TJU103是较理想的CD4/MHC II相互作用的阻断剂。据此我们推测TJU103应可预防GVHD的发生。我们的实验证实了这一推测,TJU103对T细胞介导的异体反应有显著的抑制作用。体外混合淋巴细胞培养在25 μg/ml浓度时,TJU103可抑制约83%的细胞增殖反应;体内给药则可使完全异基因移植和半相合移植GVHD发生率均显著下降,30 d生存率分别为8/10和9/10,而对照组无长期生存者(P<0.01)。

TJU103与多肽类CD4/MHC II阻断剂相比,更有望用于临床,这是因为:(1)TJU103是一种小分子非多肽化合物,合成方便,易于保存;(2)TJU103无免疫原性;(3)TJU103是根据人类的CD4分子设计的。值得注意的是TJU103的给药方法,我们在移植前将细胞悬液与TJU103共同孵育1 h,以期TJU103与CD4分子充分结合,然后再注入受者体内,此时CD4分子与MHC II类抗原的结合位点被TJU103占据,二者因此不能与MHC II类抗原稳定结合,影响CD4⁺ T细胞的活化,最后进入对接触到的抗原特异性无反应状态。

TJU103治疗降低GVHD的同时是否保留了移植物抗白血病效应,目前尚不清楚。从理论上说,T细胞仅对在TJU103存在下接触到的抗原无反应,如在移植时受者处于完全缓解期,体内肿瘤抗原微小,则T细胞有可能保留对它的反应性,从而发挥移植物抗白血病效应。

由此我们可以得出结论:TJU103是一种较好的预防GVHD的药物,有良好的临床应用前景。

参考文献:

- [1]Bolanos-Meade J. Update on the management of acute graft-versus-host disease[J]. *Curr Opin Oncol*, 2006, 18(2): 120-5.
- [2]Zhang C, Todorov I, Zhang Z, et al. Donor CD4⁺ T and B cells in transplants induce chronic graft versus host disease with autoimmune manifestations[J]. *Blood*, 2005, 105(5):2180-8.
- [3]Gallardo D, Garcia-Lopez J, Sureda A, et al. Low-dose donor CD8⁺ cells in the CD4-depleted graft prevent allogeneic marrow graft rejection and severe graft-versus-host disease for chronic myeloid leukemia patients in first chronic phase[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1997, 20(11): 945-52.
- [4]Edling AE, Choksi S, Huang Z, et al. An organic CD4 inhibitor reduces the clinical and pathological symptoms of acute experimental allergic encephalomyelitis[J]. *J Autoimmun*, 2002, 18(2): 169-79.
- [5]郑德先, 吴克复, 褚建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999: 288-9.
- [6]Ji SQ, Chen HR, Yan HM, et al. Anti-CD25 monoclonal antibody (basiliximab) for prevention of graft-versus-host disease after haploidentical bone marrow transplantation for hematological malignancies[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2005, 36(4): 349-54.
- [7]Okamoto S, Watanabe M, Yamazaki M, et al. A synthetic mimetic of CD4 is able to

suppress disease in a rodent model of immune colitis[J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(1): 355-66.

[8]Varadi G, Friedman TM, Korngold R, et al. A CD4 domain 1 CC loop peptide analogue enhances engraftment in a murine model of bone marrow transplantation with sublethal conditioning[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(12): 979-87.

[回结果列表](#)