

TJU103对小鼠同种异基因造血干细胞移植模型 GVHD 的预防作用

王三斌¹, 郭坤元², 胡灯明¹, 尹波¹ (¹成都军区昆明总医院血液科, 云南 昆明 650032; ²南方医科大学珠江医院血液科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 探讨 TJU103 对小鼠同种异基因造血干细胞移植模型移植物抗宿主病(GVHD)是否起预防作用。方法 (1)用单向混合淋巴细胞培养方法检测 TJU103 对 T 淋巴细胞增殖的影响; (2)以 BALB/c(H-2d)、CB6F1(H-2d/b) 分别作为完全异基因移植和半相合基因移植的受鼠, 给予 9.0 Gy 全身照射后 4 h, 单纯照射组经尾静脉注射 0.3 ml D-Hank's 液, 不进行细胞移植; 对照组经尾静脉注射 C57BL/6 小鼠混合细胞悬液 (4.5×10^6 骨髓细胞 + 3.0×10^7 脾细胞), 但不进行其他治疗处理; 实验组经尾静脉注射 C57BL/6 小鼠混合细胞悬液 (4.5×10^6 骨髓细胞 + 3.0×10^7 脾细胞) + TJU103 (终浓度 25 $\mu\text{g/ml}$), 此后腹腔注射 TJU103 50 $\mu\text{g/d}$, 共 7 d, 然后观察其造血恢复、植入及 GVHD 的情况。结果 (1) TJU103 可以显著抑制 T 细胞活化增殖, 其抑制作用呈剂量依赖性, 在 25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时, 可以抑制 83% 细胞增殖。(2) 由于没有给予 GVHD 防治措施, 对照组受鼠 GVHD 的发生率和死亡率分别为 10/10 和 10/10; 而完全异基因移植实验组小鼠 GVHD 发生率仅为 2/10, 30 d 生存率增加至 8/10 ($P < 0.01$), 中位生存期延长至 30 d 以上 ($P < 0.01$); 半相合基因移植实验组小鼠 GVHD 发生率为 1/10, 30 d 生存率增加至 9/10 ($P < 0.01$), 中位生存期延长至 30 d 以上 ($P < 0.01$)。结论 TJU103 不仅可以显著抑制体外 T 淋巴细胞增殖效应, 而且可显著降低小鼠同种异基因造血干细胞移植模型 GVHD 的发生率。

关键词: TJU103; 同种异基因造血干细胞移植; 移植物抗宿主病

中图分类号: R457.7; R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)06-0810-04

Role of TJU103 in prevention of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in mice

WANG San-bin¹, GUO Kun-yuan², HU Deng-ming¹, YIN Bo¹

¹Department of Hematology, Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming 650032, China; ²Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To explore the role of TJU103 in preventing graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic stem cell transplantation in mice. **Methods** BALB/c mouse splenic lymphocytes were collected and treated by mitomycin as the activating cells and the C57BL/6 mouse splenic lymphocytes as the reacting cells. In the experimental groups, the effect of TJU103 on the proliferative response of T cells was observed. BALB/c(H-2d) and CB6F1(H-2d/b) mice were used as the MHC-full-mismatched recipients and MHC-haplo-identical recipients, respectively, and pretreated by total body irradiation at 9.0 Gy before transplantation. For the recipients of the irradiation group, 0.3 ml D-Hank's solution was injected through the tail vein without cell transplantation, the recipients of the control group received injection of 4.5×10^6 bone marrow cells mixed with 3.0×10^7 spleen cells from C57BL/6 mice through the tail vein, and those in the experimental group received cell transplantation in the same manner with also injection via the tail vein of 25 $\mu\text{g/ml}$ TJU103, which was subsequently injected intraperitoneally for 7 consecutive days at daily dose of 50 μg . The hematopoietic recovery, engraftment and GVHD of the recipients were observed. **Results** TJU103 resulted in a dose-dependent inhibition of T cell proliferation in mixed lymphocyte reaction (MLR), and nearly 83% inhibition of the proliferative response was observed with the addition of 25 $\mu\text{g/ml}$ of TJU103. Without any treatment, the occurrence of GVHD and death rate in the control group was both 10/10. Daily injection of TJU103 at 50 μg for the initial post-transplantation week protected the mice from GVHD. In the MHC-full-mismatched model, the incidence of GVHD and survival rate on day 30 of the experiment group was 2/10 and 8/10, showing significant difference from those in the control group ($P < 0.01$). The median survival time (MST) was 30 days in the experimental group versus 15 days in the control group ($P < 0.05$). In the MHC-haplo-identical model, the incidence of GVHD and the survival rate on day 30 of the experimental group was 1/10 and 9/10, which were significantly different from the control group ($P < 0.01$). The MST was 30 days in the experimental group versus 14 days in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TJU103 is capable of markedly inhibiting T cell proliferative response *in vitro* and can decrease GVHD incidence after allogeneic stem cell transplantation in mice.

Key words: TJU103; allogeneic stem cell transplantation; graft-versus-host disease

收稿日期: 2005-10-22

作者简介: 王三斌(1970-), 男, 主治医师, 在读博士研究生, E-mail: wangsanbinlili@163.net

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 Kd/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 1×10^6 /ml;按终浓度25 μg/ml加入丝裂霉素(Mit C),在37℃、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 1×10^6 /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 μl及反应细胞100 μl,并按终浓度25 μg/ml加入TJU103;单纯刺激细胞组只加入刺激细胞100 μl及RPMI 1640培养液100 μl;单纯反应细胞组加入反应细胞100 μl及RPMI 1640培养液100 μl;对照组加入刺激细胞100 μl和反应细胞100 μl(每组均设3个复孔)。于37℃、5%CO₂孵箱中培养5 d后,加入³H-TdR(37 kBq/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℃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):

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

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⁶⁰Coγ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,进行异基因骨髓移植。

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 μg/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 μg,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 μg/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℃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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $(0\sim 2)\times 10^6/\text{L}$ 之间。单纯照射组小鼠不能恢复自身造血,在 2 周内 100% 死亡,说明预处理方案为骨髓性预处理。

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。

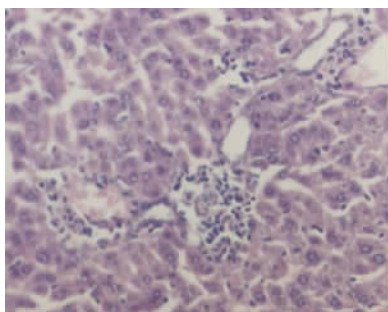


图 1 对照组 GVHD 阳性小鼠肝脏病理切片
Fig.1 Liver tissue of GVHD-positive mice in the control group(HE, original magnification: $\times 200$)

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。

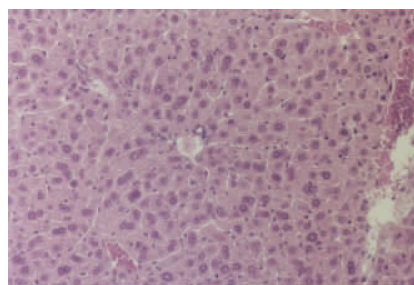


图 2 实验组 GVHD 阴性小鼠肝脏病理切片
Fig.2 Liver tissue of GVHD-negative mice in the experiment group(HE, original magnification: $\times 200$)

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,表明结果骨髓性预处理后 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植物中的供者源 T 细胞。去除移植植物中的 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。故而不去除 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-mPGPtide、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 化学名为吡啶亚甲基异烟腺,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.
- [3] 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 I 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.