

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0248-05

Tju103 和 CTLA4-Ig 诱导 MHC 半相合小鼠骨髓移植耐受比较

陈永乐¹, 郭坤元¹, 李玉华¹, 陈继跃², 张立诚¹, 严定安¹, 李江琪¹(1. 第一军医大学珠江医院血液科, 广州 510282; 2. 421 医院肿瘤科, 广州 510385)

[摘要] 目的: 观察 Tju103 和 CTLA4-Ig 各自对 MHC 半相合小鼠骨髓移植免疫耐受的诱导。方法: 半相合供鼠 T 细胞与受鼠抗原、Tju103(或 CTLA4-Ig)共育后与骨髓细胞混合移植, 观测移植后受情况。结果: A. 单纯照射组: 全部小鼠于照射后 11 d 内死于造血衰竭; B. 白血病 CTX 治疗组: 全部小鼠于接种白血病细胞后 16 ~ 23 d 死于白血病; C. 单纯移植组: 全部小鼠于移植后 21 d 内死于移植物抗宿主病(GVHD); D. CsA 预防组: 5 只小鼠于移植后 8 ~ 22 d 死亡, 1 只死于白血病, 各有 2 只死于 GVHD 和感染, 5 只活过 30 d; E. Tju103 处理组: 4 只小鼠于移植后 9 ~ 26 d 死亡, 2 只死于 GVHD, 各有 1 只死于白血病和感染, 6 只活过 30 d; F. CTLA4-Ig 处理组: 2 只小鼠于移植后 17 ~ 26 d 死亡 GVHD, 8 只活过 30 d。结论: Tju103 和 CTLA4-Ig 均明显延长生存期, 降低 GVHD 发生和严重程度, CTLA4-Ig 保留有抗感染和移植抗白血病(GVL)作用, 而 Tju103 没有。

[关键词] 半相合骨髓移植; 免疫耐受; CTLA4-Ig; Tju103; 移植物抗宿主病; 移植物抗白血病

[中图分类号] R392.4 [文献标识码] A

Comparison of Tju103 and CTLA4-Ig in Induction of Tolerance in MHC Haploidentical Bone Marrow Transplantation in Mice

CHEN Yong-le¹, GUO Kun-yuan¹, LI Yu-hua¹, CHEN Ji-yue², ZHANG Li-cheng¹, YAN Ding-an¹, LI Jiang-qi¹(1. The Department of Hematology, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; 2. The Department of Oncology, The 421 Hospital, Guangzhou 510385, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the respective effects of Tju103 and CTLA4-Ig on tolerance, post haploidentical mice bone marrow transplantation. **Methods:** In the presence of the recipient antigen, T cells from the haploidentical donors were first cultured with Tju103 or CTLA4-Ig, then mixed with the bone marrow cells and transfused into the recipients. At last, they were observed on the effect on tolerance post transplantation. **Results:** A. The only irradiated group: All the mice died of failure of hematopoiesis within 11 days post irradiation. B. The CTX-treated leukemia group: All the mice died of leukemia within 16-23 days. C. The only transplanted group: All cases died of GVHD within 21 days post transplantation. D. The CsA prophylaxis group: 5 mice died within 8-22 days after transplantation, of which one died of leukemia, and two died of GVHD and infection respectively leaving 5 survived over 30 days post transplantation. E. The Tju103 treated group: 4 mice died within 9-26 days post transplantation, of which one died of leukemia and infection respectively, and two died of GVHD leaving 6 mice survived over 30 days post transplantation. F. The CTLA4-Ig treated group: 2 mice died of GVHD within 17 ~ 26 days after transplantation leaving 8 survived over 30 days post transplantation. **Conclusions:** Tju103 or CTLA4-Ig could alone improve survival time and reduce incidence and degree of GVHD respectively. But CTLA4-Ig could preserve ability of GVL effect and anti-infection potential while Tju103 couldn't.

[Key words] haploidentical bone marrow transplantation; tolerance; CTLA4-Ig; Tju103; GVHD; GVL

* GVHD 是 MHC 半相合骨髓移植的主要并发症和致死原因, 由移植物中的 T 淋巴细胞对宿主的抗原的识别和攻击引起的。应用非特异性免疫抑制剂或去除

[基金项目] 军队医学科学基金十五重点课题项目(01Z050)
[作者简介] 陈永乐(1968-), 男, 广东惠来人, 汉族, 主治医师, 博士, 主要从事恶性血液病生物治疗研究
[通讯作者] 郭坤元

移植物中的 T 淋巴细胞是降低 GVHD 的两种主要方法,其中去除移植物中的 T 淋巴细胞能明显降低甚至消除 GVHD 的发生,但缺点是丧失了 T 细胞抗感染和白血病的功能^[1-2]。因此保留移植物中 T 淋巴细胞,并对之进行调节,诱导其对受者抗原特异性免疫耐受是移植免疫的目标。

根据 T 细胞活化的双信号理论,T 淋巴细胞的激活同时需要抗原信号和共刺激信号,没有抗原信号,T 细胞无法激活;只有抗原信号而没有共刺激信号则 T 细胞处于无能状态,产生特异性免疫耐受^[3-4]。CTLA4-Ig 是迄今为止最有效的共刺激信号阻断剂之一。应用于异基因骨髓移植中,在受者抗原存在下,CTLA4-Ig 可以明显诱导供者 T 淋巴细胞对受者抗原产生特异性耐受,降低 GVHD 的发生和严重程度,而无增加白血病复发和感染等风险^[5]。最近 Li^[6]应用计算机技术和实验,从 15 万种小分子有机化合物中筛选出一种能与 CD4 分子特异结合的物质 Tju103,调节抗原信号的传导,有效地减少小鼠异基因皮肤移植的排斥。但是 Tju103 在半相合骨髓移植的作用如何,与 CTLA4-Ig 相比又如何尚不清楚。本实验将在 MHC 半相合的小鼠骨髓移植实验中对此进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

近交系 C57BL/6 鼠(H-2^b, 雄性,8~10 周龄),CB6F1 鼠(H-2^{bd}, 雌性,8~12 周龄),均为 II 级动物,购自第一军医大学实验动物中心。

1.2 细胞株

可移植红白血病 EL9611 细胞株(用 BALB/c 鼠传代,H-2^d),由医学科学院褚建新教授惠赠,在本实验室传代、保存。

1.3 主要试剂

CsA(Novartis 公司产品),Tju103(Merck 公司产品),CTLA4-Ig(由第二军医大学免疫教研室曹雪涛教授惠赠),RPMI-1640(Gibco 公司产品),小牛血清(购自杭州四季青公司)。

1.4 EL9611 红白血病小鼠模型建立

由尾静脉给 CB6F1 鼠注射 EL9611 红白血病细胞 1×10^6 /只,当天开始饮用加入庆大霉素($32 \times 10^4 \mu\text{g/L}$)和红霉素(250 mg/L)的灭菌水,饲养于层流间,待 5 d 后移植用。

1.5 细胞制备

取 CB6F1 鼠脾脏制成单细胞悬液,溶解红细胞后经玻璃黏附分离法获得黏附于培养瓶底的巨噬细胞,经丝裂霉素($25 \mu\text{g/ml}$)处理后做特异免疫耐受诱导

源。取 C57BL/6 小鼠股骨制备单细胞悬液,溶解红细胞后调整细胞浓度为 5×10^8 /ml。取 C57BL/6 鼠脾脏制成单细胞悬液,溶解红细胞后通过尼龙毛柱,收集非黏附细胞为 T 淋巴细胞(台盼蓝染色观察细胞活性 $> 98\%$),调整 T 细胞浓度为 3×10^8 /ml。

1.6 受鼠移植前准备

接种 EL9611 细胞 5 d 后的 CB6F1 红白血病鼠作为受鼠予 ⁶⁰Co 照射(TBI,剂量率 0.5 Gy/min ,总量 10.5 Gy),5 h 后行骨髓移植。

1.7 MHC 半相合小鼠骨髓移植 GVHD 模型建立

以上获得的骨髓细胞悬液和 T 细胞悬液等体积混合,从尾静脉输入经移植前预处理的 CB6F1 代白血病小鼠体内, 0.4 ml/只 。相当于输入供者骨髓细胞 1×10^8 /只,T 细胞 6×10^7 /只。

1.8 C57BL/6 鼠 T 淋巴细胞体外调节

分 3 组:CTLA4-Ig 组:将 CTLA4-Ig(终浓度 $15 \mu\text{g/ml}$)加入经丝裂霉素处理的 CB6F1 鼠巨噬细胞悬液(5×10^6 /ml),混合静置 30 min,接着将 C57BL/6 鼠 T 淋巴细胞(1×10^7 /ml)按与刺激细胞 2:1 比例加入混匀,置 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱培养 48 h 后用 RPMI-1640 培养基洗涤 3 次,并经玻璃黏附法尽力去除 CB6F1 鼠巨噬细胞,悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液静息 24 h 待用。Tju103 组:加入 CTLA4-Ig 改为加入 Tju103(终浓度 $25 \mu\text{g/ml}$),其余步骤和 CTLA4-Ig 组同。未调节组:加入 CTLA4-Ig 改为加等量培养液,其余步骤和 CTLA4-Ig 组同。

1.9 MHC 半相合小鼠骨髓移植

浓度为 3×10^8 /ml 的 C57BL/6 鼠 T 细胞悬液和浓度为 5×10^8 /ml 的骨髓细胞悬液等体积混合,从尾静脉输入经移植前预处理的 CB6F1 白血病小鼠体内, 0.4 ml/只 。按如下分组:A 组:单纯照射组;B 组:白血病 CTX 治疗组(于注射 EL9611 细胞第 5 天起,每日腹腔注射 CTX 60 mg/kg ,连用 6 d);C 组:单纯移植组;D 组:CsA 预防组(于照射当天起,每日腹腔注射 CsA 50 mg/kg ,直到移植后 30 d);E 组:Tju103 处理组;F 组:CTLA4-Ig 处理组。

1.10 判断标准

①造血衰竭:WBC $< 0.5 \times 10^9$ /L;②白血病复发:WBC $> 20 \times 10^9$ /L,肝脾肿大,外周血可以见到红白血病细胞;③感染:WBC $> 10 \times 10^9$ /L,外周血见中性粒细胞核左移,胞浆中有中毒颗粒,腹腔见脓性渗出物;④GVHD:WBC $> 1.0 \times 10^9$ /L,脾脏萎缩,出现倦怠、纳差、消瘦、弓背、脱毛、腹泻等症状,肝脾肠皮肤有 GVHD 病理学特征;⑤造血重建:脾脏见到明显的脾结节,WBC $> 2.0 \times 10^9$ /L,Plt $> 50 \times 10^9$ /L,核型分析见 Y 染色体;

⑥长期存活:生存期 > 30 d。

1.11 观测指标

①外周血象;②病理学观察:取有 GVHD 表现的小鼠的肝、脾、肠、皮肤等组织,做石蜡切片,经 HE 染色后镜下观察;③染色体核型分析:将长期存活的移植鼠处死,按常规方法制备骨髓染色体并进行观察分析;④观测小鼠活动、体重、体形、毛发、大便等。

1.12 统计学处理

应用 SPSS 软件,作 Kaplan Meier 曲线和生存分析。

2 结果

2.1 EL9611 红白血病小鼠模型建立

白血病细胞注射量越高,发病时间越短,病情越严重,发病率越高。注射量为 1×10^6 /只时,移植鼠 100% 出现红白血病,不治疗均于接种白血病细胞后 9 ~ 11 d 内死于红白血病。

2.2 MHC 半相合小鼠骨髓移植 GVHD 模型建立

T 细胞注射量、TBI 总剂量和剂量率均和 GVHD 发生呈正相关。T 细胞输入量为 6×10^7 /只,TBI 总剂量为 10.5 Gy,剂量率为 0.5 Gy/min 时,可以确切诱导出 GVHD。移植鼠于移植后 16 d 开始出现腹泻、脱毛、消瘦、弓背和脱皮,尸检见脾脏明显萎缩。

2.3 移植小鼠生存情况

各组小鼠生存情况见(表 1),其 Kaplan-Meier 生存曲线如(图 1)。A 组:白血病小鼠于照射后 11 d 内全部(10/10 只)死亡,大部分死于照射后 4 ~ 7 d,均死于造血衰竭;B 组:白血病小鼠全部(10/10 只)于接种白血病细胞后 16 ~ 23 d 死亡,死于白血病。CTX 治疗使生存期明显延长;C 组:小鼠于移植后 16 d 开始出现症状并死亡,于 3 周内全部(10/10 只)死亡,均死于急性 GVHD;D 组:5/10 只小鼠于移植后 8 ~ 22 d 内死亡,2/10 只死于 GVHD,1/10 死于白血病,2/10 死于感染,5/10 只活过 30 d;E 组:4/10 只小鼠于移植后 11 ~ 21 d 内死亡,1/10 只死于白血病,1/10 只死于感染,2/10 只死于 GVHD,6/10 只活过 30 d;F 组:2/10 只小鼠于移植后 17 ~ 26 d 内死亡,均死于 GVHD,8/10 只活过 30 d。结果显示 CsA、Tju103 和 CTLA4-Ig 均有效地延长生存期($P < 0.05$),延迟 GVHD 发生,降低 GVHD 发生(降低发生率达 80%)和 GVHD 严重程度。但是 CsA 和 Tju103 均增加了白血病复发(CsA 和 Tju103 各增加 1/10)和感染的机会(CsA 和 Tju103 分别增加 2/10 和 1/10),生存率低于 CTLA4-Ig。活过 30 天的小鼠都获得造血重建,在移植后 60 d 内未有 GVHD 表现,外周血检查未发现 EL9611 红白血病细胞。

表 1 不同处理组小鼠存活情况($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The survival probabilities of the different treated groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	Numbers (per group)	Mean survival time (days)	Numbers died within 30 days				Numbers of Long-term survival (30 days)
			Died of hematopoietic failure	Died of infection	Died of leukemia	Died of GVHD	
A	10	5.00 ± 1.03 [▲]	10		10		
B	10	14.00 ± 1.87					
C	10	18.00 ± 1.48				10	
D	10	22.00 ± 4.73 [◆]		2	1	2	
E	10	30.00 ± 26.34 [△]		1	1	2	
F	10	40.00 ± 10.85 [*]				2	

* : F had a significant difference from any other group in mean survival time($P < 0.05$); Δ : E had no significant difference from D ($P > 0.05$), but had significant differences from A, B and C ($P < 0.05$). \blacklozenge : D was significantly different, compared with A, B and C ($P < 0.05$); \blacktriangle : Compared with B and C, A was significantly different($P < 0.05$)

2.4 病理学检查

将有 GVHD 表现的小鼠处死,取肝脏、脾脏、小肠和皮肤等组织做病理学检查(如图 2)。肝脏:肝细胞浊肿,伴灶性坏死,肝血窦及中央汇管区内有淋巴细胞浸润;脾脏:正常结构破坏,淤血,有巨噬细胞和淋巴细胞浸润;小肠:绒毛坏死脱落,黏膜和黏膜下层明显水

肿、充血,黏膜下层有淋巴细胞浸润;皮肤:结构破坏,基底层呈嗜酸性变,局部有淋巴细胞浸润。因白血病死亡的小鼠,可见肝脾明显肿大,结构破坏,有大量白血病细胞浸润。

2.5 染色体分析

取 3 只移植后长期存活的小鼠处死,检查染色体

(如图3),计算“Y”染色体出现率为17/20,15/20和16/20,说明移植成功,受者造血细胞大部分为供者型。

图1 各组小鼠生存曲线

Fig. 1 Survival curves of all groups

3 讨论

已知T细胞激活需要抗原信号和共刺激信号。没有第一信号,T细胞不能活化,缺乏共刺激信号,T细胞处于无能状态。该免疫耐受理论已经得到基础和临床实验的充分证明^[5,7-8]。

我们的实验看到CTLA4-Ig组因为阻断了共刺激信号但保留抗原信号,结果诱导出了免疫耐受,延长了存活期,降低GVHD,保留了GVL和抗感染作用;而Tju103组因为阻断抗原信号,T细胞对抗原刺激几乎没有反应,出现非特异免疫抑制,降低了GVHD,但削弱了GVL和抗感染作用。CsA通过选择性抑制TCR介导的抗原信号传递而起作用,因此实验中看到它呈非特异性免疫抑制作用。我们也尝试不加耐受诱导源孵育,结果观察到小鼠均死于GVHD。由此可见,耐受抗原的存在是诱导特异性免疫耐受成功的关键因素。

图2 GVHD鼠肝、脾、肠、皮肤病理特点

Fig. 2 Pathologic manifestations of the liver, spleen, intestine and skin from a GVHD positive mouse

A. liver: Lymphocytic infiltration, piecemeal necrosis, swelling of cells; B. spleen: Destruction of architecture, lymphocytic infiltration; C. intestine: Mucosal sloughing, edema of submucosal layer, lymphocytic infiltration; D. Skin: Hyperkeratosis, lymphocytic infiltration, hydropic degeneration

诱导T细胞特异性外周免疫耐受的机理还不清楚。由于T淋巴细胞活化正性作用途径和负性途径以及相关的分子很多,所以诱导外周免疫耐受很复杂,涉

及多个方面^[9]。目前比较肯定的就是阻断共刺激信号,可以观察到耐受作用产生^[5,7-8,10]。但因为共刺激信号属多途径传导,无法完全阻断,因此效果及持续时

间有限^[11-12]。有人联用抗 CD40L 抗体和 CTLA4-Ig 共阻断共刺激信号取得一定成功^[7]。依据双信号理论,寻找共刺激信号传导的开关点(switch point)并进行阻断可能是人为诱导特异性免疫耐受的最佳途径。

图3 移植后长期存活小鼠染色体核型分析

Fig. 3 Analysis of the chromosome type of a long-term survival mouse

Note: There appeared in the recipient the "Y" chromosome that indicated the constitution of chimerism. A. The raw chromosomes were prepared by hypotonic lysis and colchicines; B. The prepared chromosomes were rearranged by a manual method.

[参考文献]

[1] Lamb LS, Gee Ap, Parrish RS, *et al.* Acute rejection of marrow grafts in patients transplanted from a partially mismatched related donor: Clinical and immunologic characteristics[J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 17(6): 1021-1027.

[2] Gloker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vu-host disease: Pathobiology and magnagement[J]. Experimental Hematology, 2001, 29: 259-277.

[3] Medema JP, Borst J. T cell signaling: A decision of life and death [J]. Hum Immunol, 1999, 60(5): 403-411.

[4] Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. Paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively[J]. Science, 1970, 169: 1042-1049.

[5] Guina EC, Boussiotis VA, Neuberger D, *et al.* Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts[J]. New Eng J Med, 1999; 340(22): 1704-1714.

[6] Li S, Gao JM, Satoh TS, *et al.* A computer screening approach to immunoglobulin superfamily structures and interactions: Discovery of small non-peptidic CD4 inhibitors as novel immunotherapeutics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 73-78.

[7] Tanaka J, Asaka M, Imamura M. T-cell co-signaling molecules in graft-versus disease[J]. Ann Hematol, 2000, 79(6): 283-290.

[8] Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, *et al.* Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absnce of B7 costimulation[J]. Proc Ntl Aca Sci USA, 1993, 99: 6586-6590.

[9] Tomita Y, Khan A, Sykes M. Role of intrathymic clonal depletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen[J]. The J Immunol, 1994, 153: 1087-1098.

[10] Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation[J]. Immunol, Review, 2003, 192: 162-180.

[11] Ringden O. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies-controversies and recent advances[J]. Acta Oncologica, 1997, 36: 549-564.

[12] Jacobsohn DA, Vogelsang, Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD[J]. Drugs, 2002, 62(6): 879-89.

[收稿日期] 2003 - 04 - 25 [修回日期] 2003 - 07 - 20

《中国神经肿瘤杂志》创刊 欢迎投稿、欢迎订阅

我国目前唯一的神经肿瘤专业期刊《中国神经肿瘤杂志》,在原《神经肿瘤简讯》的基础上经过两年的探索,已获国际(ISSN:1726-8192)和国内(NR:4288/15/03)刊号,于2003年3月正式出版(季刊)发行。本刊在中山大学肿瘤防治中心和广州抗癌协会神经肿瘤专业委员会联合主办,我国神经肿瘤相关学科资深专家王忠诚院士、孙燕院士、吴恩惠教授、殷蔚伯教授和张福林教授担任学术指导;国内外30多位著名神经肿瘤专家教授任荣誉编委。该杂志刊登神经肿瘤基础和临床研究最新动态和与神经肿瘤相关的科研成果及临床工作经验。主要栏目有:述评、论著(包括基础和临床研究论文)、讲座、综述、短篇、文摘(国外神经肿瘤最新动态摘要)、临床病理(例)讨论及新技术、新方法介绍等。

本刊热忱欢迎广大作者、读者投稿和订阅。投稿及订阅请与《中国神经肿瘤杂志》编辑部联系,地址:广州市东风东路651号(中山大学附属肿瘤医院内),邮编:510060,电话:020-8734306,传真:020-87343336, E-mail: cjno@gzsums.edu.cn。港澳台地区可直接向出版社订阅,地址:香港蓝月出版社,香港湾仔告士大道151号国卫中心803室,电话:00852-28586023,传真:00852-25401463。