

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )02-0110-04

## 选择性去除骨髓移植物中异基因反应性淋巴细胞

刘 峰<sup>1</sup>, 楼国良<sup>1</sup>, 李永梅<sup>1</sup>, 陈 莉<sup>1</sup>, 黄正霞<sup>1</sup>, 杨宏斌<sup>1</sup>, 朱 杨<sup>3</sup>, 王梁华<sup>2</sup>, 球 谊<sup>2</sup>, 焦炳华<sup>2</sup>( 1. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; 2. 第二军医大学生化与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 第二医科大学附属新华医院, 上海 200433 )

[ 摘 要 ] 目的: 选择性去除骨髓移植物中异基因反应性淋巴细胞, 诱导异基因特异性低反应性。方法: 用携带有 FasL 基因的重组腺病毒转染 BALB/c 小鼠来源的 DC, 并与 C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞共培养, 通过混合淋巴细胞培养等方法检测异基因特异性低反应性。结果: 转染 FasL 基因的 DC 诱导了对 BALB/c 异基因反应性 T 淋巴细胞凋亡, 2 次混合淋巴细胞反应显著降低, 但并没有抑制针对第三方的反应。结论: 转染 FasL 基因的 DC 体外可有效去除骨髓移植物中异基因反应性 T 淋巴细胞, 移植用这种方法处理过的骨髓, 有希望在抑制 GVHD 的同时, 不影响移植物抗肿瘤复发和抗感染的功能。

[ 关键词 ] FasL; 树突状细胞; 移植物抗宿主病; 骨髓移植

[ 中图分类号 ] R392.4; R392.1 [ 文献标识码 ] A

## Selective Removal of Alloreactive Cells from Haematopoietic Stem Cell Grafts

LIU Feng<sup>1</sup>, LOU Guo-liang<sup>1</sup>, LI Yong-mei<sup>1</sup>, CHEN Li<sup>1</sup>, HUANG Zheng-xia<sup>1</sup>, YANG Hong-bin<sup>1</sup>, ZHU Yang<sup>3</sup>, WANG Liang-hua<sup>2</sup>, Qiu Yi<sup>2</sup>, JIAO Bing-hua<sup>2</sup>( 1. Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of biochemistry and molecular biology, Shanghai 200433, China; 3. Xinhua Hospital, Second Medical University, Shanghai 200433, China )

[ Abstract ] Objective: To obtain alloantigen-specific hyporesponsivness via depletion of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts. Methods: BALB/c mouse bone marrow-derived dendritic cells genetically engineered to express FasL were cultured with C57BL/6 mouse spleen lymphocytes, and MLR was performed to evaluate the alloantigen-specific hyporesponsivness. Results: FasL-transfected DC induced T cell apoptosis and inhibited alloantigen-specific hyporesponsiveness *in vitro*. Conclusion: DC transfected with FasL gene may prevent graft-versus-host disease by selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts

[ Key words ] FasL; dendritic cells; GVHD; bone marrow transplantation

\* 骨髓移植技术的不断发展, 为许多恶性疾病如急性慢性白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血等提供了新的希望。然而, 同种异基因骨髓移植往往伴有严重的并发症, 其中移植物抗宿主病( graft versus host disease, GVHD )因其高发病率、高死亡率, 成为影响骨髓移植发展的最大障碍之一。

为了控制 GVHD 的发生发展, 临床上常在移植前大量去除移植物中的淋巴细胞, 或在移植后施以大量的免疫抑制剂。虽然一定程度上控制了 GVHD, 但是肿瘤复发和感染的几率却大大增加, 移植物成活的几率也因 T 细胞的减少而降低, 因此并没有明显降低患者的总体死亡率<sup>[1,2]</sup>。GVHD 与移植物抗白血病( graft versus leukemia, GVL )作用似乎总是此消彼消, 此长彼长。但越来越多的证据表明, GVHD 和 GVL 是可以分离的<sup>[3]</sup>。本文即介绍一种有望可以保留 GVL 而抑制

GVHD 的独特方法。

树突状细胞( dendritic cells, DC )是功能最强大的专职抗原提呈细胞, 目前发现只有它可以激活初始型 T 淋巴细胞。骨髓移植后, 宿主的抗原提呈细胞把自身抗原提呈给供体来源的 T 淋巴细胞, T 细胞被活化并增殖分化成效应细胞, 攻击受体导致 GVHD 发生<sup>[4]</sup>。DC 某些亚群高表达 FasL, 与其接触的 T 细胞不是被活化, 而是被清除<sup>[5]</sup>。本研究即模拟这种生理机制, 体外给受体来源的 DC 转染 FasL 基因, 并与供体的淋巴细胞共培养, 从而选择性清除异基因反应性 T 细胞, 而

[ 基金项目 ] 全军医学科研十五计划面上项目( 01MA159 )

[ 作者简介 ] 刘 峰( 1974- ), 男, 山东临沂人, 硕士, 主要从事肿瘤免疫和治疗方面的研究

[ 通讯作者 ] 刘 峰, E-mail: liufengdr@yahoo.com.cn

保留具有抗肿瘤和抗感染功能的淋巴细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

BALB/c(H-2<sup>d</sup>), C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)和 C3H(H-2<sup>k</sup>)小鼠均为雄性,6~8周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。本实验中 BALB/c 小鼠作为骨髓移植的受体,C57BL/6 小鼠作为供体,C3H 小鼠作为无关第三者。

### 1.2 主要试剂

携带人 FasL 基因的重组腺病毒 AdFasL 及 LacZ 基因的重组腺病毒 AdLacZ 由本课题组构建,另文发表。[<sup>3</sup>H]-TdR 及 Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> 为 Amersham 公司产品;IL-4,IL-2,GM-CSF 为 R&D 公司产品;PE 标记的抗 CD3 单抗、FITC 标记的抗 H-2K<sup>b</sup> 单抗及同型对照抗体为 Caltag Laboratories 产品;Biotin 标记抗人 FasL 单抗为 Pharmingen 产品;FITC 标记的抗小鼠 CD80, CD86, MHC II 单抗及同型对照为 Chemicon 公司产品;Rhodamine123(R123)为 Molecular Probes 公司产品。

### 1.3 骨髓 DC 的培养及基因修饰

DC 培养参考 Inaba<sup>[6]</sup>的方法略作修改,详见文献[7],收集培养至第 5 天 DC,少量无血清培养基悬浮,按重复感染指数(MOI)50 加入 AdFasL 或 AdLacZ,孵育 1 h 后再补足 RPMI-1640 和血清。24 h 后或其它适当时间收集,并用 RPMI-1640 洗 2 遍用于后续实验。转染后的 DC 分别记作 FasL-DC 和 LacZ-DC(本实验中用作对照)。培养至第 7 天未转染的 DC 记作 Day-7-DC。

### 1.4 流式分析基因转染后 FasL 在 DC 的表达及 DC 表型和活性的变化

分别用 FITC 标记的抗-小鼠 CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、MHC II 单抗和抗人 FasL 单抗,以及同型对照单抗和 R123,标记基因转染后 30 h 的 DC 及未转染的 DC,标记后 PBS 洗 2 遍,进行 FACS 分析。

### 1.5 检测 FasL 活性

无菌取 C57BL/6 小鼠脾脏,用 200 目钢网制备成单细胞悬液,Tris-NH<sub>4</sub>CL 裂解红细胞,洗后用尼龙毛分离法获得 T 淋巴细胞,以 10:1 与 BALB/c 来源的 FasL-DC, LacZ-DC, Day-7-DC 共培养 48 h,用抗-小鼠 CD3-PE 单抗和 R123 标记细胞,流式检测 T 细胞凋亡。

### 1.6 混合淋巴细胞反应

制备 C57BL/6 小鼠脾 T 淋巴细胞悬液(体外实验代替作为骨髓移植体),以 10:1 与 BALB/c 来源的 FasL-DC, LacZ-DC(对照), Day-7-DC(对照)共培养 48 h,用抗 B2.12 中和抗体加低毒兔补体溶去 DC,存活的淋巴细胞用作反应细胞。C57BL/6(H-2<sup>b</sup>), BALB/c

(H-2<sup>d</sup>)(对照)和 C3H(H-2<sup>k</sup>)(对照)小鼠脾淋巴细胞 3000rad $\gamma$  射线照射后,用作刺激细胞,与反应细胞以适当比例在 U 型底 96 孔板混合培养 72 h,均设 3 复孔。于结束前 16 h 加入 [<sup>3</sup>H]-TdR(0.5  $\mu$ Ci/孔),收集细胞后, $\beta$  液闪仪计数 cpm 值。

### 1.7 <sup>51</sup>Cr 释放法检测 CTL 活性

制备 C57BL/6 小鼠脾 T 淋巴细胞悬液,以 10:1 与 BALB/c 来源的 FasL-DC, LacZ-DC, Day-7-DC 共培养 48 h,用抗 B2.12 中和抗体加低毒兔补体溶去 DC,存活的淋巴细胞用作反应细胞。BALB/c(H-2<sup>d</sup>), C57BL/6(H-2<sup>b</sup>)和 C3H(H-2<sup>k</sup>)小鼠脾淋巴细胞 3 000 rad $\gamma$  射线照射后,用作刺激细胞,与反应细胞以 4:1 的比例在含有小鼠 IL-2(100 U/ml)完全培养基中继续培养,第 10 天收集存活的细胞作为效应细胞。用 Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>(0.3 mCi/ml)标记 BALB/c, C57BL/6 和 C3H 小鼠脾淋巴细胞 1 h,2 次洗涤后作为靶细胞,与效应细胞分别以 10:1,20:1,40:1,80:1 的效靶比铺 96 孔板,4 h 后收集上清用  $\gamma$  计数仪检测 cpm 值。均作 3 复孔,并设最大释放组和自然释放组。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{\text{实验组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}} \times 100\%$$

### 1.8 统计学分析

计量资料两样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  认为统计学差异显著。

## 2 结果

### 2.1 DC 有效表达 FasL

腺病毒是一种高效的基因转移载体,AdFasL 转染 24 h 后 DC 即有较高的 FasL 表达(图 1)。曾经认为给 DC 转染 FasL 基因会导致 DC 自身凋亡,但有关实验证实 DC 可表达多种分子抑制 FasL/Fas 途径的凋亡,我们在基因转染后 24、48 h 后检测也均未发现 DC 的凋亡(图 2)。另外,基因转染没有影响 DC 活性,其主要表面分子 CD80(B7-1),CD86(B7-2),MHC II 等表达没有明显改变(图略)。这些说明 FasL 基因转染 DC 作为一种应用方式是可行的。

图 1 流式分析基因转染后 FasL 在 DC 的表达

Fig. 1 FasL expression in DC by flow-cytometric analysis  
A: Control DC; B: FasL-transfected DC

图2 流式分析 FasL 基因转染后 30 h DC 的凋亡情况

Fig. 2 DC apoptosis 30 h after gene transfection

A: Day-7-DC; B: LacZ-DC; C: FasL-DC

2.2 转染 FasL 基因的 DC 可有效诱导反应性 T 淋巴细胞凋亡

BALB/c 小鼠 FasL-DC 与异基因 C57BL/6 小鼠脾 T 淋巴细胞共培养 48 h 后,通过流式分析,可检测到明显 T 细胞凋亡,而 LacZ-DC, Day-7-DC 处理的对照组未发现明显凋亡(图 3)。说明 FasL-DC 可有效诱导反应性 T 淋巴细胞凋亡。

2.3 转染 FasL 基因的 DC 诱导特异性异基因低反应性

BALB/c 小鼠(受体)FasL-DC 与异基因 C57BL/6 小鼠脾(供体)T 淋巴细胞共培养(在 GVHD 中认为是受体 DC 激活了供体 T 细胞<sup>[4]</sup>)。3 d 后收集存活的淋巴细胞用作反应细胞,与放射灭活的 BALB/c, C57BL/6 和 C3H 小鼠脾淋巴细胞共培养 72 h, [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入法检测淋巴细胞增殖情况。如图 4 所示,经 FasL-DC 预处理组与对照组相比显著抑制了淋巴细胞增殖( $P < 0.05$ ),但在与无关第三者(C3H)细胞共培养时,仍显示出强的增殖能力。结果表明 FasL 基因修饰的 DC 不但能诱导低反应性,而且具有抗原特异性。

2.4 转染 FasL 基因的 DC 有效抑制了 GVHD 效应 T 细胞的产生

细胞毒性 T 细胞是 GVHD 最主要效应细胞,抑制这部分细胞的产生可有效抑制 GVHD 发生。体外用受体细胞刺激供体淋巴细胞可诱导产生这种效应细胞,但是用 FasL-DC 预处理供体淋巴细胞,可有效抑制这种效应细胞的产生;同样,这种抑制是特异性的,因为 FasL-DC 预处理供体淋巴细胞仍可产生针对第三方(C3H)的细胞毒性(图 5)。因为是特异性抑制因此它也保留了抗肿瘤抗感染的功能。

图3 FasL-DC 诱导 T 细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of T cell induced by FasL-DC

图4 FasL-DC 抑制同种异基因 MLR

Fig. 4 Inhibition of allogenic MLR by FasL-DC

3 讨论

GVHD 因其高发病率、高死亡率,严重阻碍了骨髓移植的发展。目前临床上尚无可靠的方法既能抑制 GVHD 的发生,同时又可保留 GVL 作用。本研究结果显示,FasL 基因转染的 DC 可以诱导异基因反应性 T 细胞凋亡,从而选择性清除异基因反应性 T 细胞。移植用这种方法处理过的骨髓细胞移植,将有助于抑制 GVHD 的发生,而并不损害其抗肿瘤抗感染的功能,

从而克服了大量无选择性清除移植物中淋巴细胞和应用大量免疫抑制剂来抑制 GVHD 的缺点。

图5 FasL-DC 特异性抑制 CTL 产生

Fig.5 Inhibition of specific CTL cytotoxicity by FasL-DC

有些学者曾通过静脉、腹腔等途径应用转染 FasL 基因的抗原提呈细胞,来清除体内反应性 T 细胞,从而达到抑制心脏、肝脏移植排斥反应或一些过敏反应、自身免疫反应的目的<sup>[8-10]</sup>。但应用方式的缺陷限制了他们的效果,这是因为不管是静脉还是腹腔途径给予 DC,DC 只是引流到了局部的淋巴组织,而没有均匀地分布到全身淋巴组织<sup>[11]</sup>,所以也就不可能有效地清除全身反应性淋巴细胞。尽管是反复体内大量应用,效果并不十分理想也不持久。在本实验中却可避免这个缺陷,因为,用 FasL-DC 处理骨髓细胞移植物是在体外完成的,是在培养瓶这个有限的空间实现的,可以让 DC 一次性有效地与几乎所有反应性 T 细胞接触并诱导它们凋亡,且 DC 的用量很少。当然,如果通过一定的方法对 DC 进行改造,使其在体内具有大范围迁移的能力,FasL-DC 或其它形式的 DC 将会有更好的应用前景。

人们在体外清除反应性淋巴细胞方面已做了很多的实验,运用了各种各样的方法,但至今仍然没有一种让人满意的方案。Hartwig 等<sup>[12]</sup>用添加 Fas 单抗的方法来诱导反应性淋巴细胞凋亡,和本研究思路很类似,但这种方法也有个缺点,就是特异还不够强,因为除了异基因反应性淋巴细胞表达 Fas,骨髓细胞移植物也有其它一些细胞会表达 Fas,比如已活化的具有抗感染功能的 T 细胞等,而且 FasL/Fas 相结合后还需要一定程度的交联才能有效传导凋亡信号,这也限制了单抗的效果<sup>[12]</sup>。另外 Fas 单抗因具有很强的毒性,基本不可以体内应用。FasL-DC 则克服了这些缺点。DC 呈递抗原给 T 细胞是特异性的,因此 FasL-DC 杀伤 T 细胞也是特异性的,本实验已证实了这一点,而且转染后的

DC 表面可高表达 FasL,所以杀伤很有效;另外,FasL 基因转染后的 DC 非常安全,即使是体内应用。

以腺病毒为载体的重组人 p53 基因治疗药物 Gendicine 已在深圳问世,是世界上第一个获得新药证书和获准上市的基因治疗药品,开创了基因治疗临床应用的先河。本研究模拟体内高表达 FasL 的 DC 亚群的生理机制,用携带有 FasL 基因的重组腺病毒转染 DC,在体外有效地清除了异基因反应性 T 细胞。本课题组正在进行相关的体内实验,希望能以基因治疗为手段为 GVHD 治疗寻找一个突破口,为临床应用提供有用的实验数据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[ J ]. *Blood*, 2001, 98( 12 ): 3192-3204.
- [ 2 ] Martin PJ. Donor CD8<sup>+</sup> cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: Potential implications for marrow transplantation in humans[ J ]. *J Exp Med*, 1993, 178( 2 ): 703-712.
- [ 3 ] Barrett AJ, Rezvani K, Solomon S, *et al.* New Developments in Allotransplant Immunology[ J ]. *Hematology ( Am Soc Hematol Educ Program )*, 2003: 350-371.
- [ 4 ] Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells[ J ]. *Science*, 1999, 285( 5426 ): 412-415.
- [ 5 ] Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis[ J ]. *J Exp Med*, 1996, 183( 4 ): 1789-1796.
- [ 6 ] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[ J ]. *J Exp Med*, 1992, 176( 6 ): 1693-1702.
- [ 7 ] 楼国良, 王全兴, 陈国友, 等. 可溶性 TNF 受体基因修饰的树突状细胞诱导抗原特异性肿瘤免疫耐受机理[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8( 2 ): 88-92.
- [ 8 ] Min WP, Gorczynski R, Huang XY, *et al.* Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival[ J ]. *J Immunol*, 2000, 164( 1 ): 161-167.
- [ 9 ] Zhang HG, Su X, Liu D, *et al.* Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells[ J ]. *J Immunol*, 1999, 162( 3 ): 1423-1430.
- [ 10 ] Matsue H, Matsue K, Kusuhiro M, *et al.* Immunosuppressive properties of CD95L-transduced "killer" hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells[ J ]. *Blood*, 2001, 98( 12 ): 3465-3472.
- [ 11 ] Morse MA, Coleman RE, Akabani G, *et al.* Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies[ J ]. *Cancer Res*, 1999, 59( 1 ): 56-58.
- [ 12 ] Hartwig UF, Robbers M, Wickenhauser C, *et al.* Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death[ J ]. *Blood*, 2002, 99( 8 ): 3041-3049.