

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0129-04

## 活化半相合混合骨髓移植 GVHD 反应的动物实验研究

葛林阜<sup>1</sup>, 姜国胜<sup>2</sup>, 刘希民<sup>1</sup>, 黄宁<sup>1</sup>, 刘传芳<sup>3</sup>, 唐天华<sup>2</sup>, 董政军<sup>1</sup>, 马焕文<sup>1</sup>, 张玉昆<sup>2</sup>, 孔凡盛<sup>1</sup>, 郭鹏<sup>1</sup>  
(1. 济南军区总医院血液科, 济南 250031; 2. 山东省医学科学院基础所血液肿瘤学研究室, 济南 250062; 3. 山东大学齐鲁医院血液肿瘤中心, 济南 250012)

[摘要] 目的: 观察活化半相合混合骨髓移植的 GVHD 反应。方法: 以急性放射病 615 小鼠模型为受鼠, 615 × C57BL/6 杂交 F1 代小鼠为半相合供鼠。半相合鼠骨髓和脾细胞中混合一定比例的同基因脾细胞, 经白细胞介素-2 体外活化后, 进行活化半相合混合骨髓移植。观察移植后小鼠死亡率、白细胞系造血重建、脾结节、体内混合淋巴细胞培养、嵌合体及病理学改变, 比较不同移植方式的 GVHD 反应。结果: 活化半相合骨髓移植组与未活化半相合骨髓移植组具有明显的 GVHD 反应。供受鼠 3:1 活化半相合混合骨髓移植不能明显降低 GVHD 反应, 供受鼠脾细胞比例 1:1 和 2:1 移植组可以明显减轻 GVHD 反应。表现为外周血白细胞及骨髓造血恢复快, 体内混合淋巴细胞反应降低及嵌合体百分率升高。结论: 活化半相合混合骨髓移植方式可以降低 GVHD 反应, 并与同基因和异基因脾细胞比例有关。

[关键词] 骨髓移植; 半相合; 移植抗宿主病; 小鼠

[中图分类号] R457.7; R392.4 [文献标识码] A

## GVHD in Activated Half-Matched Mixed Bone Marrow Transplantation in Experimental Animal Models

GE Lin-fu<sup>1</sup>, JIANG Guo-sheng<sup>2</sup>, LIU Xi-min<sup>3</sup>, HUANG Ning<sup>1</sup>, LIU Chuan-fang<sup>3</sup>, TANG Tian-hua<sup>2</sup>, DONG Zhen-jun<sup>1</sup>, MA Huan-wen<sup>1</sup>, ZHANG Yu-kun<sup>2</sup>, KONG Fan-sheng<sup>1</sup>, GUO Peng<sup>1</sup> (1. Department of Hematology, General Hospital of Jinan Command PLA, Jinan 250031, China; 2. Department of Hematology and Oncology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China; 3. Centre of Hematology and Oncology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe graft-versus-host disease (GVHD) reaction in activated half-matched mixed bone marrow transplantation (BMT). **Methods:** Mice 615 with acute radiation disease were used as recipient mice model, with 615C57BL/6 hybrid F1 mice being half-matched donor mice. Half-matched murine bone marrow and spleen cells mixed with certain percent of syngeneic spleen cells were activated *in vitro* with IL-2 and underwent mixed half-matched BMT to observe their death rate, hematopoietic recovery of myelocytic lineage, spleen node count, mixed lymphocyte reaction *in vivo*, chimerism and pathological changes, to compared with GVHD reactions of various transplant models. **Results:** GVHD was relatively severe in both activated and non-activated half-matched BMT groups, showing that activated half-matched mixed 3:1 BMT group after activation could not alleviate GVHD, whereas the activated half-matched mixed 1:1 BMT group or 2:1 group with high percentage of syngeneic spleen cells could lessen the extent of GVHD, as manifested by the quick recovery of peripheral blood WBC count and bone marrow GM-CFU formation, by the low of mixed lymphocyte reaction *in vivo* as well as by the increase of chimeric rate. **Conclusions:** Half-matched mixed BMT after activation could lower the GVHD reaction, which was relative to the ratio of syngeneic to allogeneic spleen cells.

[Key words] bone marrow transplantation (BMT); half-matched; graft-versus-host disease (GVHD); mice

\*<sup>1</sup> 随着异基因骨髓移植(Allo-BMT)在白血病治疗中的广泛应用, 现已有约 50% 患者可获得长期治愈存

[基金项目] 济南军区“十五”医药卫生重点课题 02Z75

[作者简介] 葛林阜(1951-), 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事恶性血液病的诊断与治疗研究

活。目前影响疗效的最大障碍仍是移植物抗宿主病(GVHD),并成为移植相关死亡的主要原因,如何选择既减轻GVHD反应又同时保留GVL作用的治疗方法,成为国内外学者关注和研究的热点之一。本研究从增加主要组织相容性的角度进行了半相合混合骨髓移植减少GVHD反应的实验,取得初步结果。现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

受鼠615小鼠(H-2k),18~20g,雄性(中国医学科学院动物中心提供)。实验组半相合供鼠为F<sub>1</sub>代615×C<sub>57</sub>BL/6杂交鼠,雌性。异基因鼠为C<sub>57</sub>BL/6小鼠(H-2b)。辐照受鼠:<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射剂量率为10cGy/min,总剂量8.0Gy,于山东省农科院辐射中心进行。

### 1.2 供鼠脾细胞体外培养

按常规分离脾单个核细胞,常规低渗法去除红细胞后,调至 $2 \times 10^7$ /ml,加mIL-2 0.1ml( $1 \times 10^3$ U/ml,晶美公司提供)37℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养3d,收集细胞,1000r/min 15min,N.S洗2次后,调细胞至 $4 \times 10^7$ /ml。

### 1.3 供鼠骨髓细胞体外培养

无菌条件下常规分离骨髓细胞按上述方法进行体外培养,调细胞数为 $2 \times 10^7$ /ml。

### 1.4 骨髓移植及分组

活化半相合组:将体外活化的615×C<sub>57</sub>BL/6杂交F<sub>1</sub>代鼠脾细胞与骨髓细胞按 $5 \times 10^6$ 与 $1.0 \times 10^7$ 比例经尾静脉注入615小鼠体内;非活化半相合组:将C<sub>57</sub>BL/6鼠脾细胞与骨髓细胞按 $5 \times 10^6$ 与 $1.0 \times 10^7$ 比例经尾静脉注入615小鼠体内;供受体鼠脾细胞1:1活化半相合混合组(以下称活化半相合混合1:1组); $5 \times 10^6$ 供受体1:1混合活化脾细胞与615×C<sub>57</sub>BL/6杂交F<sub>1</sub>代鼠骨髓细胞 $1.0 \times 10^7$ 移植给615鼠;供受体鼠脾细胞2:1活化半相合混合组(以下称活化半相合混合2:1组);供受体2:1混合活化脾细胞 $5 \times 10^6$ 与615×C<sub>57</sub>BL/6杂交F<sub>1</sub>代鼠骨髓细胞 $1.0 \times 10^7$ 移植给615鼠;供受体鼠脾细胞3:1活化半相合混合组(以下称活化半相合混合3:1组);供受体3:1混合活化脾细胞 $5 \times 10^6$ 与615×C<sub>57</sub>BL/6杂交F<sub>1</sub>代鼠骨髓细胞 $1.0 \times 10^7$ 移植给615鼠。

### 1.5 观察与检测指标

(1)一般GVHD反应:脱毛、体位、大小便。(2)常规病理学检查。(3)30d死亡率观察。(4)外周血象的变化:按常规方法进行,观察移植后7,14,21d时的外周血象变化。(5)嵌合体的测定:于移植后第7天和

第14天进行。小鼠处死前5h,尾静脉注射秋水仙碱7 $\mu$ g/kg,5h后拉颈处死小鼠,无菌条件下取出骨髓过4号针头,使之成为单个核细胞悬液,离心1000r/min 10min,低渗处理,吸取上清液,加入预温37℃的0.075mol/LKCl溶液中。37℃静置20min,加入1:3醋酸:甲醇固定液1ml,吹打均匀,1000r/min 10min,弃上清液,加固定液10ml,吹匀,置15min,重复固定1次,末次离心后,弃上清。留下固定液0.5~1ml,滴片,凉干,Giemsa染色,镜下观察20~30个分裂相。(6)小鼠脾结节测定。移植后12d,拉颈处死小鼠,取出整体脾脏,立即放入Bouin氏液中固定,0.5h后,解剖镜下计数脾结节。(7)体内混合淋巴细胞培养。移植后4d,经腹腔注射<sup>125</sup>I-UdR(2 $\mu$ Ci)8h后拉颈处死小鼠,取脾脏放入70%乙醇中,浸泡3d,每天更换浸泡液,在闪烁计数仪上计数脾脏放射性元素每分钟闪烁数(cpm/min)和注入<sup>125</sup>I-UdR标准cpm/min,并以脾脏重量更正。

## 2 结 果

### 2.1 GVHD反应

一般状况:活化半相合与未活化半相合2组GVHD反应较明显,脱毛现象发生率分别为30%(6/20)和25%(5/20),轻度弓背体位发生率分别为40%(8/20)和30%(6/20),大便次数增多及便稀现象的发生率分别为20%(4/20)和25%(5/20)。2组间的发生率无明显差别。活化半相合混合1:1组与2:1组GVHD反应较轻,以弓背体位及腹泻为主,活化半相合混合3:1组的GVHD反应明显,反应程度同活化或非活化半相合组。活化半相合组、未活化半相合组、活化半相合混合1:1组、活化半相合混合2:1组及活化半相合混合3:1组的30d死亡率分别为50%(10/20),45%(9/20),10%(2/20),25%(5/20)和55%(11/20)。

### 2.2 病理学检查

根据皮肤、脾脏、肝脏和小肠的病理改变,活化半相合组、未活化半相合组及活化半相合混合3:1组为GVHD II级反应,活化半相合混合1:1组和2:1组为GVHD I级反应。

### 2.3 受体鼠外周血白细胞的变化

受体鼠外周血白细胞的变化,以活化半相合混合1:1组恢复最高,活化半相合混合2:1组次之,活化半相合组、未活化半相合组、活化半相合混合3:1组的恢复水平较上述2组为低,但该3组之间无明显差别( $P > 0.05$ )。说明异基因与同基因脾细胞1:1和2:1的活化半相合混合骨髓移植可以减轻GVHD反应,有利受体鼠造血恢复,减少死亡率(表1)。

2.4 受体鼠骨髓 GM-CFU 的变化

1:1组和2:1组恢复为较高,两组间无显著性差异( $P > 0.05$ , 表1)。

受体鼠接受不同骨髓移植后,均有较高水平的 GM-CFU 生成率。其中以活化半相合混合骨髓移植

表1 BMT 后骨髓 GM-CFU 测定  
Tab.1 Bone marrow GM-CFU after BMT

Groups	n	CFU-GM/10 <sup>5</sup>		
		7d	14 d	21 d
Half-matched	10	25.0 ± 3.4	52.0 ± 5.20	77.0 ± 7.5
Activated half-matched	10	26.0 ± 5.4	48.0 ± 4.5	73.0 ± 6.2
Activated half-matched mixed 1:1	10	38.0 ± 5.7	71.0 ± 5.2	87.0 ± 5.7
Activated half-matched mixed 2:1	10	36.0 ± 4.6	68.0 ± 4.7	82.0 ± 5.6
Activated half-matched mixed 3:1	10	29.0 ± 3.7	56.0 ± 5.6	71.9 ± 6.5
Control	10	106.0 ± 7.6	107.0 ± 9.2	112.0 ± 8.7

2.5 受体鼠及外周血细胞测定

半相合混合 3:1 组的白细胞较低(表2)。

活化半相合对照组、未活化半相合对照组及活化

表2 BMT 后外周血细胞测定  
Tab.2 Peripheral blood WBC count after BMT

Groups	n	WBC ( × 10 <sup>9</sup> )		
		7d	14 d	21 d
Half-matched	10	0.37 ± 0.05	0.92 ± 0.13	7.36 ± 0.47
Activated half-matched	10	0.35 ± 0.06	0.76 ± 0.17	7.16 ± 0.52
Activated half-matched mixed 1:1	10	0.56 ± 0.05	1.39 ± 0.06	8.32 ± 0.51
Activated half-matched mixed 2:1	10	0.49 ± 0.07	1.21 ± 0.19	8.43 ± 0.43
Activated half-matched mixed 3:1	10	0.39 ± 0.04	0.98 ± 0.20	7.76 ± 0.39
Control	10	10.7 ± 0.64	10.3 ± 0.67	11.2 ± 0.57

2.6 受体鼠脾脏结节的变化

移植后第 12 天,观测各实验组脾脏结节数,半相合,活化半相合,活化半相合混合 1:1,2:1,3:1 组的脾脏结节数分别为( 77.6 ± 6.8 )/脾膈面、( 44.3 ± 12.6 )/脾膈面、( 117.8 ± 21.6 )/脾膈面、( 94.3 ± 18.2 )/脾膈面和( 67.5 ± 13.8 )/脾膈面。从受体鼠脾脏结节的计数结果发现,活化半相合混合 1:1 组和 2:1 组结节数较高,与活化半相合对照组、未活化半相合对照组或活化半相合混合 3:1 组比较,并具有明显的统计学意义( $P < 0.05$ )。说明活化半相合混合 1:1 和活化半相合混合 2:1 组的移植方式可以明显的促进受体鼠造血恢复。

2.7 受体鼠体内混合淋巴细胞培养的测定结果

<sup>125</sup>I-UdR 摄入试验表明活化半相合混合 1:1 组和 2:1 组的脾淋巴细胞反应较弱。半相合组、活化半相合组和活化半相合混合 3:1 组体内混合淋巴细胞反应较强,并以活化半相合组最明显。按脾脏 <sup>125</sup>I-UdR 摄取率(%) = (脾脏细胞计数 - 本底) / (标准计数 - 本底) × 100% 计算。移植 6 d 后半相合组,活化半相合组,活化半相合混合 1:1, 2:1, 3:1 组 <sup>125</sup>I-UdR 摄取率分别为( 0.32 ± 0.036 )%, ( 0.54 ± 0.061 )%, ( 0.17 ± 0.038 )%, ( 0.19 ± 0.026 )% 和 ( 0.47 ± 0.041 )%。经统计学分析,活化半相合混合 1:1 和 2:1 组的 <sup>125</sup>I-UdR 摄取率较其它组低。

## 2.8 活化半相合混合骨髓移植受体鼠体内嵌合体测定结果

于移植后第7天各组Y染色体所占比例分别为:活化半相合组65%(13/20),半相合组60%(12/20),活化半相合混合1:1组为75%(15/20),活化半相合混合2:1组为70%(14/20),活化半相合混合3:1组为55%(11/20)。经比较以活化半相合混合1:1组和活化半相合混合2:1组为嵌合体高。移植后第14天各组Y染色体所占比例有变化,活化半相合组为35%(7/20),半相合组40%(8/20),活化半相合混合1:1组50%(10/20),活化半相合混合2:1组60%(12/20),活化半相合混合3:1组为45%(9/20)。移植后28d时,除了半相合混合1:1组和2:1组嵌合体为10%(2/20)和20%(4/20)外,其余各组的嵌合体分别均为0%。

## 3 讨论

近年来,急性白血病的Allo-BMT研究与应用有了很大进展。然而,因为主要组织相容性抗原复合物(major histocompatibility complex, MHC)屏障的存在,使GVHD仍是移植相关死亡的主要原因之一。所以,如何防止或减少GVHD反应是国内外学者关注的热点之一。业已证明,GVHD反应与供者的T细胞有关。骨髓移植后,供者的T细胞识别受者MHC系统,从而激活细胞毒T细胞,活化的T细胞释放多种淋巴细胞因子,引起非特异性组织细胞损害。根据GVHD反应的发生机制,目前在如何防止GVHD方面已有较多的探索与实验<sup>[1-3]</sup>。结果表明,采用单克隆抗体等方法清除供体骨髓中T细胞可以减少GVHD反应,但白血病的复发率和移植失败率也明显升高<sup>[2-3]</sup>,这是由于异基因骨髓中T细胞的去除,使得移植抗白血病(GVL)主要效应细胞减少<sup>[4]</sup>。这种伴随移植治疗白血病失败或复发率升高的事实不支持单纯清除T细胞的移植方式<sup>[5]</sup>。经过进一步的研究证实,少量多次骨髓移植<sup>[6]</sup>及混合骨髓移植<sup>[7-8]</sup>等方法可以不同程度地减轻GVHD反应<sup>[9]</sup>。

本实验在证实活化半相合骨髓移植减轻GVHD反应基础上,借鉴其他学者利用混合供受体骨髓细胞移植方法可以减少GVHD反应的结果<sup>[8]</sup>,将活化半相合骨髓移植与混合骨髓移植相结合,进行活化半相合混合骨髓移植。结果表明作为对照的活化与非活化半相合骨髓移植均发生明显GVHD反应,而活化半相合混

合1:1组和活化半相合混合2:1组GVHD反应明显减弱。具体表现为活化半相合混合1:1组和活化半相合混合2:1组的脾淋巴细胞反应较弱,外周白细胞数量增高,骨髓GM-CFU集落形成较多,30d生存率较高。而异基因脾细胞和同基因脾细胞3:1组则不能明显减轻GVHD反应。说明同基因脾细胞比例较高的活化半相合混合骨髓移植方式才可以降低GVHD反应,减少GVHD造成的死亡。至于该移植方式降低GVHD反应的具体机制,部分学者认为其归因于同基因淋巴细胞经抑制异基因淋巴细胞反应而诱导耐受性<sup>[8]</sup>。本文研究结果初步表明,供受体活化脾细胞在一定合适比例下可明显减少移植排斥反应,但是此种移植方式的抗白血病作用尚需进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Gendeman M, Yassai M, Tivol E, *et al.* Selective elimination of alloreactive donor T cells attenuates graft-versus-host disease and enhances T-cell reconstitution[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003, 9(12): 742-752.
- [2] 罗辉, 胡盛惠, 杨平地. 清除小鼠特异性活化淋巴细胞预防移植抗宿主病的研究[J]. *中华血液学杂志*, 1995, 16(10): 521-523.
- [3] Butturini A, Gale RP. T cell depletion in bone marrow transplantation for leukemia: Current results and future directions[J]. *BMT*, 1988, 3: 185-192.
- [4] Paul JM, John A, Hansen C. Effects of *in vitro* depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts[J]. *Blood*, 1985, 66: 664-671.
- [5] Trenado A, Charlotte F, Fisson S, *et al.* Recipient-type specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(11): 1688-1696.
- [6] 项莺松, 杨如俊, 孟祥顺, 等. 小鼠骨髓程序移植的实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 1998, 19(12): 634-637.
- [7] Ildstad ST, Wren SM, Bluestone JA. Effects of selective T cell depletion of host and/or donor bone marrow on lymphopoietic repopulation, tolerance, and graft-versus-host disease on mixed allogeneic chimeras(B10<sup>+</sup>B10D2 $\rightarrow$ B10)[J]. *J Immunol*, 1996, 136: 28-33.
- [8] 罗辉, 杨平地, 贺福初. 混合骨髓移植的实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 1998, 19(8): 418-421.
- [9] Nakamura K, Inaba M, Sugiura K, *et al.* Enhancement of allogeneic hematopoietic stem cell engraftment and prevention of GVHD by intra-bone marrow transplantation plus donor lymphocyte[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(2): 125-134.

[收稿日期] 2003-12-10

[修回日期] 2004-03-05