

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0244-05

小鼠同基因型移植物抗宿主病发生机制及其意义

刘兴田, 张利宁, 王玉坤, 王晓燕, 高丽芬, 王 群, 李 娜, 张 蘋, 高 飞 (山东大学医学院免疫学研究所, 济南 250012)

[摘 要] **目的:** 初步探讨小鼠同基因型移植物抗宿主病(SGVHD)的发生机制, 为研究移植物抗白血病效应奠定基础。**方法:** 用同基因骨髓细胞重建致死剂量 X 线照射的小鼠, 用环孢素 A(CsA)腹腔注射诱导治疗 21 d。停药后每日观察小鼠临床症状, 在小鼠出现 GVHD 样症状时, 取肝脏、结肠、耳朵、皮肤和胸腺进行组织学检查, 并检测肝脏、结肠组织细胞因子和协同刺激分子的表达。**结果:** 67% (19/28)的模型组小鼠产生 GVHD 样症状, 组织病理检查发现 GVHD 样小鼠结肠和肝脏有组织坏死和大量炎细胞浸润, 而移植对照组均未出现 GVHD 样症状, 组织学未见明显异常。RT-PCR 检测发现 GVHD 样小鼠结肠和肝脏组织中共刺激分子 CD137mRNA 水平和细胞因子 IL-12、IFN- γ 和 TNF- α mRNA 水平较移植对照组小鼠的水平升高。**结论:** CsA 可诱导同基因型骨髓移植小鼠产生 GVHD 样症状, Th1 类细胞因子参与了 SGVHD 的发生, 为进一步研究 SGVHD 的抗肿瘤机制建立了技术平台。

[关键词] 同基因型移植物抗宿主病; 细胞因子; 抗肿瘤

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A

Immunological Mechanism of Mouse Syngeneic Graft Versus Host Disease Model and Its Significance

LIU Xing-tian, ZHANG Li-ning, WANG Yu-kun, WANG Xiao-yan, GAO Li-fen, WANG Qun, LI Na, ZHANG Pin, GAO Fei (Institute of Immunology, School of Medicine, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To primarily explore the immunological mechanism of SGVHD and provide a platform for study of graft-versus leukemia. **Methods:** Lethally irradiated C3H/HeJ mice were reconstructed with syngeneic bone marrow cells and induced with cyclosporine (CsA) for 21d. After cessation of CsA , the clinical symptoms of SGVHD(such as weight loss, diarrhea, hunching, runting) were observed. The histological changes of murine liver, colon, skin, thymus and ear were examined by routine pathological methods. Meanwhile, the expression of cytokines in mice colon and liver were examined by RT-PCR. **Results:** 67% (19/28) of mice developed GVHD - like clinical symptom in SGVHD-induced group and their pathological detection of liver and colon showed tissue necrosis and increased lymphocyte infiltration . The levels of costimulatory molecule (CD137) and Th1-type cytokines(IL-12, IFN- γ and TNF- α)mRNA were enhanced in liver and colon of SGVHD mice, compared with control mice. **Conclusion:** The CsA can induce syngeneic BMT recipients of C3H/HeJ mice to develop SGVHD, and costimulatory molecules and Th1 type cytokines played an important role in development of SGVHD.

[Key words] SGVHD; cytokine; anti-tumor

骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)是治疗白血病、恶性肿瘤、再生障碍性贫血及免疫缺陷等疾病的重要手段, 是以细胞为主的免疫治疗方式之一。骨髓移植可以分为同种异基因骨髓移植和同基因或自身骨髓移植两种方式。同种异基因骨髓移植因供体骨髓的缺乏和移植后严重移植物抗宿主病(GVHD)的发

生, 限制了其应用。同基因型骨髓移植因骨髓来源方便及无明显的并发症, 应用较为广泛, 但易复发。

临床资料和动物实验均显示 GVHD 具有抗白血病

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30271247)

[作者简介] 刘兴田(1964 -), 男, 山东泰安人, 主要从事肿瘤免疫和骨髓移植研究

[通讯作者] 张利宁, E-mail: immuno@sdu.edu.cn

作用(graft-versus leukemia, GVL),能降低白血病的复发。故人们推测,自身或同基因型 BMT 受者白血病复发的主要原因之一可能是无 GVL 作用,因此,如果在自身或同基因型骨髓移植后能诱导适度的 GVHD 产生 GVL 将可预防白血病的复发。后来,Glazier 和 Bryson 等^[1,2]先后用环孢霉素 A(CsA)短期治疗在同基因型骨髓移植的大鼠和小鼠人工诱导出 GVHD 样症状,称同基因型 GVHD(syngeneic GVHD, sGVHD)。Giralts^[3]在多发骨髓瘤患者自身骨髓移植中成功诱导出 SGVHD,令人们感兴趣的是发现 SGVHD 同样具有抗白血病作用,可减低白血病的复发。但目前对 SGVHD 及 GVL 产生的机理尚不清楚,使其应用受到一定限制。本实验旨在建立小鼠同基因型移植抗宿主病模型,初步探讨 SGVHD 发生的免疫机制,为进一步研究移植抗白血病效应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂来源

C3H/HeJ 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,20~21 d 日龄,到达后 1 周内进行骨髓移植,用消毒的食物和酸化水喂养,饲养在消毒的鼠盒内。环孢素 A(CsA)购于北京诺华制药公司,橄榄油购于北京神州油橄榄技术开发公司,RPMI-1640 为 Gibco 产品,PCR 试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,TRIZOL 为 Pharmigen 公司产品;部分本实验室常用试剂。

1.2 小鼠 SGVHD 的诱导

按照 Bryson^[2]建立的方法诱导小鼠 SGVHD。100 只鼠中 16 只作为正常对照,其它进行骨髓移植和 SGVHD 模型的建立。(1)受体鼠的预处理:骨髓移植前 4~6 h 用 SL-18 直线加速器(飞利浦公司)以致死剂量 X-射线(900 cGy)照射受体鼠,以破坏其自身骨髓,然后分为照射对照组、sGVHD 模型组和骨髓移植对照组,每组 28 只小鼠。(2)供体骨髓的制备:取同基因型小鼠胫骨、股骨分离骨髓,用抗 Thy. 1 的抗体和补体清除 Thy. 1 细胞以制备去 Thy. 1 细胞的供体骨髓细胞(5×10^7 个/ml)。(3)骨髓移植:将 5×10^6 个供体骨髓细胞(0.1 ml)经尾静脉注射给 sGVHD 模型组和骨髓移植对照组受体鼠,使之重建骨髓。照射对照组小鼠仅注射相同体积的 PBS 溶液。(4)CsA 诱导:骨髓移植后模型组小鼠腹腔注射 0.1 ml CsA 橄榄油溶液,15 mg/(kg·d),连续注射 21 d。照射对照组和移植对照组小鼠注射相同体积的橄榄油溶液,注射时间与模型组相同。

1.3 小鼠临床症状的观察

停用 CsA 后每日观察实验小鼠的临床症状,并称量小鼠体重。若在停用 CsA 后 2~3 周内小鼠出现 GVHD 的临床症状,如体重下降(每周称重 3 次,连续 3 次体重下降为阳性)、腹泻、发育不良等即可疑为 SGVHD^[2]。此时,取小鼠结肠、肝脏、耳朵、皮肤和胸腺进行组织病理、CD137 和细胞因子检测,并称量胸腺重量。

1.4 小鼠组织病理学检查

用 10% 甲醛固定肝和结肠标本,常规石蜡包埋,制备 4~6 μ m 厚的切片,用苏木素-伊红进行染色,通过双盲法由病理学专家进行诊断并根据已建立的 SGVHD 炎症分级标准^[2]进行评分分级。

1.5 RT-PCR 检测肝脏和结肠组织 CD137 和细胞因子的表达

小鼠肝脏和结肠总 RNA 的提取、反转录合成 cDNA 和 PCR 扩增均按试剂说明书进行。不同细胞因子的 PCR 引物:CD137 sense 5'-GATGAATTCATGGGAACA GCT GTTAC-3', antisense 5'-GAATGACGTCCTGCGGAGAGTGTCTCTGG-3'; IL-12 p40 Sense 5'-GGA GACCCTGCCCTGTGAACT-3', antisense 5'-CAACGTTGCATCCTAGGATCG-3'; IFN- γ sense 5'-T ACTGCCACGGCACAGTCATTGAA-3', antisense 5'-GCAGCGACTCCTTTTCCGCTTCCT-3'; TNF- α sense 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3', antisense 5'-TACAGGCTTGTAC TCGAATT-3'; β -actin sense 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', antisense 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像系统扫描,并运用 ImageMaster Gel ANALYSIS SOFTWARE 分析软件进行分析,每个细胞因子特异性条带的 OD 值除以相应的 β -actin 条带的 OD 值使之标准化,以分析表达水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件对实验数据进行分析, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 分别作为差异有显著性和极显著性的标准。

2 结果

2.1 小鼠 SGVHD 发病率

C3H/HeJ 小鼠接受 X 射线照射后分为 3 组:照射对照组,同基因型骨髓移植对照组和同基因型骨髓移植 SGVHD 模型诱导组。照射对照组不接受骨髓移植,于照射后 12~14 d 内全部死亡。SGVHD 模型诱导组小鼠于停用 CsA 后 2~3 周出现体重下降、腹泻、发育迟缓、翘毛等症状。在模型组 28 只小鼠中共有 19 只(67%)发生 GVHD 样症状。移植对照组小鼠停止腹

腔注射橄榄油后,未发生 GVHD 样反应。模型组小鼠临床出现 GVHD 症状后,处死部分小鼠,取肝脏和结肠进行病理和细胞因子检测。留部分小鼠进一步观察。从图(1)可以看出,观察期间移植对照组小鼠体重逐渐增长,而模型诱导组小鼠在停用 CsA 后 2~3 周,体重开始向下降,4~5 周后体重有逐渐升高,恢复正常。说明这些小鼠 SGVHD 模型与人自身骨髓移植后 CsA 诱导的 GVHD 具有相似的特点,均具有自限性。

2.2 小鼠组织病理学变化

停用 CsA 2~3 周后取出现 GVHD 样临床症状的模型组小鼠及接受同基因型骨髓移植对照组小鼠的肝脏、结肠和胸腺进行常规病理检测。同基因型骨髓移植对照组小鼠的胸腺增生活跃,结肠和肝脏没有明显发改变。诱导组中出现 GVHD 样症状小鼠的胸腺增生不活跃;结肠和肝脏出现 GVHD 样损伤,表现为结肠黏膜破坏、黏膜下出现大量炎细胞浸润;肝脏呈现中度水肿、汇管区大量淋巴细胞浸润(图 2)。

2.3 SGVHD 小鼠肝脏和结肠内 CD137 和细胞因子变化

从 10 例出现 GVHD 样症状小鼠的肝脏和结肠组

织中抽提总 RNA,反转录合成 cDNA,然后用 CD137, IL-12, IFN- γ , TNF- α 特异性引物进行半定量 PCR 检测,同时以 β -actin 作为内参照,PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳观察,各特异性条带的 OD 值除以 β -actin OD 值标准化后,比较各细胞因子的表达水平。结果如图(3)显示,与 10 只对照组小鼠相比,GVHD 样小鼠结肠组织中 CD137, IL-12, IFN- γ 表达明显增高, TNF- α 略有升高。

图 1 停用 CsA 后小鼠体重变化

Fig.1 Changes of mice weights after CsA cessation

图 2 小鼠同基因型骨髓移植后结肠、肝脏和胸腺组织病理学变化

Fig.2 Histopathological changes of colon, liver and thymus following syngeneic BMT

A: Colon of control mouse; B: Colon of SGVHD mouse; C: Liver of control mouse; D: Liver of SGVHD mouse; E: Thymus of control mouse; F: Thymus of SGVHD mouse infiltrated; \uparrow : Inflammatory cells

2.4 胸腺大小与 CsA 和 SGVHD 阳性的关系

小鼠接受 X-射线照射后胸腺发生萎缩,但随着同基因型骨髓移植后小鼠造血以及免疫功能的重建,胸腺发育也逐渐恢复,同基因型骨髓移植对照组 10 例小鼠胸腺重量平均 23.5 ± 3.42 mg。但注射 CsA 的同基

因型骨髓移植诱导组小鼠的胸腺较同基因型骨髓移植对照组小鼠的胸腺肉眼观察体积小,重量也较轻,10 例出现 GVHD 样症状的小鼠胸腺重量平均 10.0 ± 4.06 mg,两者间的重量有显著性差异($P < 0.01$)。同基因型骨髓移植诱导组小鼠中有 67% 产生 SGVHD,

SGVHD 阳性小鼠的胸腺较未发生 SGVHD 小鼠的胸腺重量轻。经 Spearman 等级相关分析发现,在使用 CsA 的同基因型骨髓移植诱导组小鼠中胸腺重量与 SGVHD 呈负相关, $r_s = -0.828$ 。

3 讨论

同基因型移植抗宿主疾病(syngeneic graft-versus-host disease, SGVHD)是指用环孢素 A(CsA)短期治疗同基因型骨髓移植的受者而人工诱导出的 GVHD

样症状。研究^[1,3,4]发现 SGVHD 具有抗白血病作用,从而使得同基因骨髓移植后疾病容易复发这一难题有所改观。因此,搞清 SGVHD 的发生机制显得尤为重要。有实验表明多种免疫细胞(包括 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等)、Th1 类细胞因子(IL-12, IFN- γ , TNF- α 等)及某些化学物质如 NO 等参与了 SGVHD 的病理过程,其主要组织病变发生在肠道和肝脏,尤其是远端结肠部位^[5-7]。

图 3 RT-PCR 检测小鼠 CD137 和细胞因子表达

Fig. 3 Expression of CD137 and cytokine mRNA detected by RT-PCR

A: IL-12; B: IFN- γ ; C: TNF- α ; D: CD-137

本试验发现,小鼠同基因型骨髓移植后 SGVHD 诱导阳性者结肠和肝脏发生不同程度的炎症变化,主要表现为结肠黏膜破坏,黏膜下炎症细胞大量浸润;肝脏发生水肿样变,汇管区有炎细胞浸润。而同基因骨髓移植对照组小鼠结肠黏膜完整,未见明显炎细胞浸润;肝脏汇管区仅有散在淋巴细胞。说明 SGVHD 时结肠和肝脏发生炎症反应而引起病理改变。RT-PCR 检测发现,SGVHD 小鼠结肠和肝脏组织中 CD137 和 Th1 类细胞因子 IL-12, IFN- γ , TNF- α 等较对照组小鼠水平明显升高。由于共刺激分子 CD137 和 Th1 类细胞因子主要参与体内的炎症反应,其水平升高与组织病理学检查所见炎细胞浸润相符合。这些结果与我们的前期试验结果^[8,9]和文献报道^[2,6]相一致。

胸腺是机体的中枢免疫器官,是 T 细胞发育成熟的场所。在实验过程中,小鼠接受致死剂量的 X-射线照射后,T 细胞与胸腺均受到严重损害,胸腺发生萎缩,体积变小,重量变轻。随着同基因型骨髓移植后小鼠造血和免疫功能的逐步重建,胸腺也逐渐恢复,体积逐步增大,重量渐渐增加。但使用 CsA 的诱导组小鼠的胸腺则恢复缓慢,SGVHD 阳性小鼠的胸腺则体积更小,重量更轻。组织病理检测显示同基因移植对照小鼠胸腺增生活跃,而 SGVHD 阳性小鼠的胸腺增生不活跃。从而说明 CsA 的使用影响了胸腺内细胞的增生,

但其详细机制尚不明确。另有研究发现^[10-12],CsA 可能通过改变了胸腺组织微环境,抑制胸腺组织包括胸腺基底组织和胸腺细胞的正常发育,而导致自身反应性 T 细胞产生,进而引起增强的自身免疫反应。

众所周知,机体的抗肿瘤机制主要依赖于以下几个方面:(1)抗体作用;(2)NK 细胞;(3)巨噬细胞;(4)T 细胞;(5)细胞因子。这些因素水平的升高往往与机体的免疫功能增强有关。实验显示,SGVHD 小鼠靶组织中 IFN- γ , TNF- α 和 IL-12 水平升高。IL-12 可以促进 NK 细胞的活化,提高 NK 细胞毒性,活化的 NK 细胞又可以促进 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌。IFN- γ 是巨噬细胞潜在的激活剂,活化的巨噬细胞可以杀伤对 T 细胞和 NK 细胞有抵抗性的肿瘤细胞。TNF- α 可以参与机体的炎症反应和抗肿瘤作用。从而提示,SGVHD 时机体免疫功能的改变可能有助于机体抗肿瘤作用的发挥,这与文献[4]报道相符合。

综上所述,本实验结果表明 SGVHD 的发生机制非常复杂,CsA 可能通过改变胸腺组织微环境,抑制胸腺增生,影响 T 细胞发育而导致自身反应性 T 细胞产生并输出到外周,继而引起自身反应性炎症的发生。同时,病变组织中共刺激分子 CD137 和 Th1 类细胞因子 IL-12, IFN- γ , TNF- α 水平增高。机体免疫功能的这种改变既参与炎症反应的形成导致 SGVHD 的发生,又可

能促进机体非特异性抗肿瘤作用的提高。本实验成功建立了小鼠 SGVHD 模型,为进一步研究 SGVHD 的抗肿瘤作用建立了一个平台,并为 SGVHD 的临床应用奠定理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Glazier A, Tutschka PJ, Farmer ER, *et al.* Graft-versus host disease in cyclosporine a treated rats after syngeneic and autologous bone marrow reconstitution[J]. *J Exp Med*, 1983, 158(1): 1-8.
- [2] Bryson JS, Jennings CD, Caywood BE, *et al.* Induction of a syngeneic graft-versus-host disease-like syndrome in DBA/2 mice[J]. *Transplantation*, 1989, 48(6): 1042-1047.
- [3] Giralts S, Weber D, Colome M, *et al.* Phase I trial of cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease in patients with multiple myeloma undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell rescue[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(2): 667-673.
- [4] Bryson JS, Jennings CD, Lowery DM, *et al.* Rejection of an MHC class II negative tumor following induction of murine syngeneic graft-versus-host disease[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23(4): 363-372.
- [5] Hess AD, Thoburn CJ, Miura Y, *et al.* Antigen-specific T-lymphocyte responses in acute and chronic syngeneic graft-versus-host disease[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1): 53-56.
- [6] Flanagan DL, Jennings CD, Bryson JS. Th1 cytokines and NK cells participate in the development of murine syngeneic graft-versus-host disease[J]. *J Immunol*, 1999, 163(3): 1170-1177.
- [7] Flanagan DM, Jennings CD, Goes SW, *et al.* Nitric oxide participates in the intestinal pathology associated with murine syngeneic graft-versus-host disease[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 762-768.
- [8] 张利宁, Bryson JS. 结肠上皮内 CD4⁺CD8⁻/CD4⁻CD8⁺αβT 淋巴细胞及细胞因子在 sGVHD 发生发展中的改变[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(5): 537-540.
- [9] Bryson JS, Zhang L, Goes SW, *et al.* CD4⁺ T cells mediate murine syngeneic graft-versus-host disease-associated colitis[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 679-687.
- [10] Cheney RT, Sprent J. Capacity of cyclosporine to induce auto-graft-versus-host disease and impair intrathymic T cell differentiation[J]. *Transplantation Proc*, 1985, 17: 528-536.
- [11] Fischer AC, Ruvolo PP, Burt R, *et al.* Characterization of the autoreactive T cell repertoire in cyclosporin-induced syngeneic graft-versus-host disease. A highly conserved repertoire mediates autoaggression[J]. *J Immunol*, 1995, 154(8): 3713-3725.
- [12] Beschornor WE, Divic J, Pulido H, *et al.* Enhancement of thymic recovery after cyclosporine by recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I[J]. *Transplantation*, 1991, 52(5): 879-884.

[收稿日期] 2005 - 07 - 26

[修回日期] 2005 - 08 - 25

[本文编辑] 王莹

《实用肿瘤杂志》征订启事

《实用肿瘤杂志》是中华人民共和国教育部主管,浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊为中国科技核心期刊、中国生物医学核心期刊,本刊 1992、1996、2000 年连续被列为中文核心期刊,并被列为医学院校研究生教育 A 类期刊。本刊为中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被《中国科学引文数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国生物医学文摘光盘数据库》等几十家数据库收录。本刊突出实用性,主要栏目有专家论坛、专题讨论、基础与临床研究、技术与经验、药物与临床、流行病学调查、综述与讲座、误诊分析、短篇报道与个案等,适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作者阅读、参与。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大 16 开,92 页,每逢双月 10 日出版。每期定价 8.00 元,全年 48.00 元。本刊刊号 ISSN1001-1692 CN33-1074/R,邮发代号 32-87,国外发行代号 4816BM,全国各地邮局均可订阅。如果订阅延误,可汇款至杭州市解放路 88 号浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话:(0571) 87783654

传真:(0571) 87783654

邮编:310009