

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0423-05

吲哚胺 2,3-二氧化酶基因修饰的 DCs 对小鼠移植抗宿主病的抑制作用

史平¹, 楼国良^{1*}, 周俊平¹, 张文颖¹, 朱海沫¹, 王梁华², 焦炳华² (1. 第二军医大学附属长海医院特需诊疗科, 上海 200433; 2. 第二军医大学基础医学部生化与分子生物教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨小鼠树突状细胞(dendritic cells, DCs)转染吲哚胺 2,3-二氧化酶(indolamine 2,3-dioxygenase, *IDO*)基因后对移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的抑制作用。方法: 用携带 *IDO* 基因的重组腺病毒感染 BALB/c 小鼠来源的树突状细胞, 后者与 C57BL/6 小鼠骨髓移植共培养, 将经过处理的骨髓移植给 BALB/c 小鼠(C57BL/6→BALB/c 小鼠 GVHD 模型, H-2^b→H-2^d), 观察、比较各组 GVHD 表现(包括 GVHD 评分、生存期、病理学改变), 并行嵌合体检测及观察混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)。结果: 致死剂量照射的受体小鼠接受经 *IDO* 处理的骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)后, 未出现明显的 GVHD 反应, 生存期显著延长, 3 个月时生存率大于 80% ; 对照组均在移植后 2 周左右出现明显的 GVHD 表现, 生存期未超过 1 个月。IDO-DC 治疗组未出现明显的组织病理学损害; 3 个月时 IDO-DC 治疗组仍然保持比较高的嵌合; IDO-DC 组的 T 细胞对 C57BL/6、BALB/c 淋巴细胞的反应性与对 C3H 淋巴细胞反应性相比显著降低($P < 0.05$)。结论: 经 *IDO* 基因修饰的 DCs 可以选择性去除骨髓移植中异基因反应性 T 细胞, 从而特异性地抑制 GVHD 并能及早地免疫重建。

[关键词] 吲哚胺 2,3-二氧化酶; 树突状细胞; 恶性血液病; 同种异基因造血干细胞移植; 移植抗宿主病

[中图分类号] R730.5 **[文献标志码]** A

Inhibition of graft-versus-host disease by indolamine 2,3-dioxygenase gene-modified dendritic cells

SHI Ping¹, LOU Guo-liang^{1*}, ZHOU Jun-ping¹, ZHANG Wen-ying¹, ZHU Hai-mo¹, WANG Liang-hua², JIAO Bing-hua² (1. Department of Special Clinic, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of dendritic cells modified by indolamine 2, 3-dioxygenase (*IDO*) against graft-versus-host disease (GVHD). **Methods:** BALB/c-derived dendritic cells (DCs) were transfected with recombinant adenovirus harboring *IDO* gene and the product was co-cultured with bone marrow graft of C57BL/6 mice. Modified bone marrow graft was transplanted into BALB/c mice (C57BL/6 to BALB/c mice GVHD model system, H-2^b→H-2^d). The symptoms of GVHD (GVHD score, survival period, pathological changes) were observed and compared between different groups. Detection of engraftment and mixed lymphocyte reaction were also performed. **Results:** Mice treated with lethal dose irradiation had no obvious GVHD symptoms after transplanted with *IDO*-modified bone marrow, and had prolonged survival period, with the 3-month survival rate higher than 80%. Mice in the control group had obvious GVHD symptoms 2 weeks after transplantation, with a survival period less than 1 month. IDO-DC treatment group had no obvious pathological lesions and showed higher engraftment after 3 months. T cells in IDO-DC group had a lower reactivity to C57BL/6, BALB/c lymphocytes than to C3H lymphocytes ($P < 0.05$). **Conclusion:** *IDO* gene-modified DCs can specifically deplete alloreactive T cells from bone marrow graft.

[Key words] indolamine 2,3-dioxygenase; dendritic cells; malignant hematopathy; allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; graft versus host disease

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 423-427]

[基金项目] 全军医学科研十一五计划面上项目(NO.01MA159)。Supported by the Medical Science Research "Eleventh Five-Year-Plan" of the PLA

[作者简介] 史平(1971-), 女, 江苏南京人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事恶性血液病免疫治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: gllou@hotmail.com

同种异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)是治疗恶性和非恶性血液病、遗传性疾病和自身免疫性疾病的重要方法,可以达到临床痊愈。移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD),尤其急性GVHD,是异基因造血干细胞移植应用中最棘手的问题,是移植后致残及相关死亡的主要原因。GVHD的本质是由供者的免疫活性细胞介导的、一种损害性的反应体系,是炎症背景下供者T细胞对受者次要组织相容性抗原的识别^[1]。

目前GVHD的防治首选免疫抑制疗法及将T细胞清除等,尽管能有效地减少GVHD的发生率,但付出了移植效能降低、感染机会增加的代价^[2]。因此,理想的方法是寻找使T细胞处于激活状态,保持移植物抗白血病(graft-versus-leukemia, GVL)效应,但同时特异性同种抗原又是抑制的免疫应答^[3]。Munn等^[4,8]研究认为:树突状细胞可以是抑制性的,也可以是刺激性的,这取决于当前的各种条件是否能导致对功能性免疫抑制性吲哚胺2,3-二氧化酶(indolamine 2,3-dioxygenase, IDO)的诱导。本研究探讨用受体来源的小鼠树突状细胞,转染IDO基因后体外与供体骨髓细胞移植物混合培养,选择性清除引起GVHD反应的T淋巴细胞,从而保留GVL效应并能及早地免疫重建。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

携带小鼠IDO基因的重组腺病毒(AdIDO)由第二军医大学免疫研究所王全兴教授馈赠,携带LacZ基因的重组腺病毒(AdLacZ)由本实验组构建。^[3H]-TdR为Amersham公司产品;重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和重组小鼠白细胞介素4(rmIL-4)购于R&D公司;FITC标记的抗H-2K^b单抗及同型对照抗体为Caltag Laboratories产品。

1.2 骨髓DCs的培养及基因修饰

DCs培养参考Inaba^[20]的方法略作修改。收集培养至第5天的DCs,少量无血清培养液悬浮,按重复感染指数100加入AdIDO或AdLacZ,孵育1h后再补足RPMI 1640和血清。24h后或其他适当时间收集,并用RPMI 1640洗2遍用于后续实验。转染后的DC分别记作IDO-DC和LacZ-DC(用作对照)。培养到第7天未转染的DC记作Day-7-DC。

1.3 实验动物及照射条件

清洁级近交系小鼠BALB/c(H-2^b)、C57BL/6(H-2^d)、C3H(H-2^k)购自上海中科院实验动物中

心,8~10周龄,体重20~22g,雄性,饲养于第二军医大学SPF级动物房[实验动物合格证号SCXK(沪)2002-0006]。C57BL/6为骨髓移植供体,BALB/c为受体,用⁶⁰Co γ 射线照射,照射剂量率20cGy/min,总剂量9Gy。C3H小鼠作为无关第三者。

1.4 移植物制备及预处理

无菌取C57BL/6小鼠股骨和胫骨以及脾脏,分别制备骨髓细胞和脾细胞,经Tris-NH₄Cl裂解红细胞,计数后按1:2混合,用含10%小牛血清(FCS)的RPMI 1640培养液在6孔板中培养(3×10⁷个细胞/孔),同时加入IDO-DC或LacZ-DC(1×10⁶/孔)。培养48h后收集细胞计数备用。

1.5 异基因骨髓移植以及治疗分组

术前5d,受体BALB/c小鼠开始饮用含红霉素(250mg/L)和庆大霉素(320mg/L)的抗生素溶液进行肠道准备。于骨髓移植当天,接受一次性致死性全身照射(TBI),剂量为9Gy。随机分4组(每组10只小鼠)。A组为空白对照组,照射后尾静脉0.5ml PBS;B组为未治疗组,照射后移植3×10⁷个未经处理的骨髓细胞移植物,作为阳性对照;C组为LacZ-DC治疗组,照射后移植3×10⁷个经LacZ-DC处理的骨髓细胞移植物;D组为IDO-DC治疗组,照射后移植3×10⁷个经IDO-DC处理的骨髓细胞移植物。

1.6 GVHD临床观察

移植后观察体重(以移植第1天体重为参照,计算体重变化百分数)、体位(弓背)、毛发(脱毛、毛乱)、腹泻、活性及生存期。GVHD评分(移植后2周):0分为正常,1分为轻度,2分为中度,3分为重度。体重降低0%~10%为轻度,11%~20%为中度,大于20%为重度。体重变化率(%)=[(移植后观察日体重-移植前1天体重)/移植前1天体重]×100%

1.7 病理学检查

移植后2周取各组肝脏、小肠、皮肤等组织,10%甲醛液固定,石蜡包埋,切片经H-E染色后显微镜下观察。

1.8 FACS嵌合体分析

为了评价供体细胞植入和存活情况,于骨髓移植后3周和3个月时,取各组小鼠外周血,肝素抗凝,加入1 μ l FITC标记的抗H-2K^b单克隆抗体,置4℃孵育45min;Tris-NH₄Cl裂解红细胞,PBS洗2遍后,经流式细胞仪进行检测。同时取正常C57BL/6和BALB/c小鼠外周血分别作为阳性和阴性对照。

1.9 混合淋巴细胞反应

取移植后2个月受体BALB/c小鼠脾脏制备T淋巴细胞悬液,用作反应细胞。正常BALB/c(H-2^b)、

C57BL/6(H-2^d), C3H(H-2^k)小鼠脾淋巴细胞3 000 Gy γ 射线照射后用作刺激细胞,与反应细胞以1:1比例(各 5×10^5 细胞)在U型底96孔板混合培养24、48、72、96 h,均设复孔。于结束前16 h加入 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ (3.7×10^4 Bq),收集细胞后, β 液闪仪计数cpm值。

1.10 统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数的比较采用 t 检验,生存分析采用log-rank检验。

2 结果

2.1 转染IDO的DCs对鼠GVHD临床症状的影响

不管是未治疗组还是LacZ-DC治疗组,小鼠在2周后均出现了明显的GVHD症状:脱毛、腹泻、弓背体位、体重持续下降、活动能力差等,GVHD评分在10分左右(表1);而IDO-DC组仅出现轻微的毛乱、活动稍减少等,体重下降3周后又重新增加,所有GVHD表现在2个月内基本消失,GVHD评分4分左右,显著低于未治疗组和LacZ-DC($P < 0.05$)。

2.2 IDO-DC对GVHD鼠生存期的影响

IDO-DC治疗组3个月生存率在80%以上,而对照组生存期没有超过30 d,治疗组与对照组相比有显著差异($P < 0.05$, log-rank test,图1)。

表1 IDO-DC对鼠GVHD临床表现评分的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Influence of IDO-DC on GVHD score of mice

Groups	Diarrhea	Hair	Activity	Weight	Total score
LacZ-DC	2.60 \pm 0.75	2.69 \pm 0.50	2.70 \pm 0.48	2.72 \pm 0.51	10.69 \pm 0.99
IDO-DC	0.11 \pm 0.30	1.11 \pm 0.30	1.01 \pm 0.50	1.72 \pm 0.47	4.00 \pm 0.90*
Untreated	2.77 \pm 0.45	2.43 \pm 0.53	2.37 \pm 0.50	2.40 \pm 0.51	10.11 \pm 1.00

* $P < 0.05$ vs LacZ-DC or untreated group

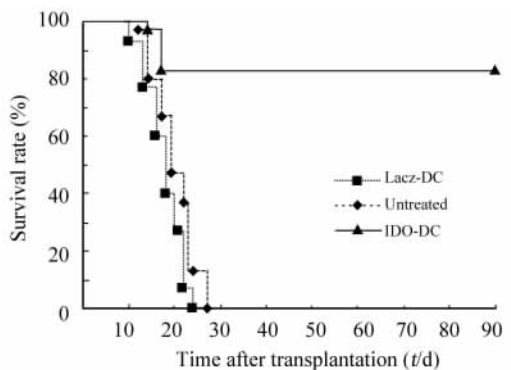


图1 IDO-DC降低实验鼠GVHD相关的病死率

Fig. 1 IDO-DC reduced GVHD-related mortality of mice

2.3 IDO-DC对鼠GVHD病理改变的影响

未治疗组和LacZ-DC治疗组大多表现有肝脏正常结构的破坏,肝细胞浑浊,伴有灶性坏死,汇管区及中央静脉和肝血窦扩张、淤血,肝窦及汇管区内有较多分叶细胞浸润,并有淤胆现象;皮肤表现为真皮层毛细血管明显扩张,有淋巴细胞和分叶核细胞浸润,角质层和真皮层分离;肠黏膜和黏膜下层明显水肿、充血,部分肠黏膜糜烂,上皮细胞坏死、脱落,黏膜下层有大量炎性细胞与淋巴细胞浸润。IDO-DC组则没有明显的类似病理改变(图2)。

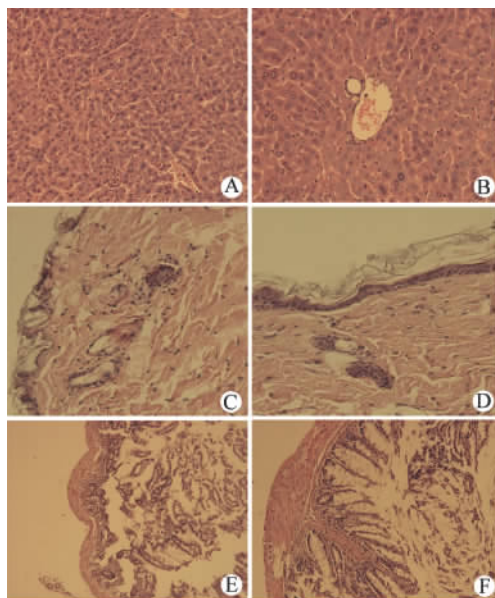


图2 移植后鼠GVHD组织病理学检查(H-E, $\times 100$)

Fig. 2 Histopathologic examination of mice GVHD after transplantation (H-E, $\times 100$)

A: Control liver; B: IDO-DC-treated liver; C: Control skin; D: IDO-DC-treated skin; E: Control intestine; F: IDO-DC-treated intestine

2.4 各组实验鼠外周血嵌合体分析

嵌合体分析结果可见,3周时各组均有供体细胞嵌

合,其中 LacZ-DC 组为(91.02 ±6.05)% (n =4),IDO-DC 组为(99.03 ±4.82)% (n =8);3 个月时 IDO-DC 治疗组仍然保持比较高的嵌合,为(72.99 ±5.34)% (n =8),对照组在 1 个月后就告死亡(图 3)。

2.5 实验小鼠的混合淋巴细胞反应

IDO-DC 组的 T 细胞对 C57BL/6、BALB/c 淋巴细胞的反应性与对 C3H 淋巴细胞反应性相比显著降低,即对供体和受体抗原的反应性都较低,而对无关第三方的反应仍然很高。表明 IDO-DC 不仅能诱导低反应性,且具有抗原特异性($P < 0.05$, 图 4)。

异型抗原的攻击^[14]。急性 GVHD 临床主要表现为皮肤、肝脏、肠黏膜的损害^[3-5]。

防治急性 GVHD 的经典方案是应用免疫抑制剂,或者将移植中 T 细胞去除。上述方法尽管有效地减少了 GVHD 的发生率,但共同的缺陷是:移植排斥率升高,GVL 效应的削弱使白血病复发率增加,免疫重建的延迟导致感染机会增多^[6-7]。

因此,有必要探求去除特异性针对宿主同种抗原 T 细胞的方法,而不是盲目地全面的“免疫压制”。藉此在控制 GVHD 的同时,保留移植物的 GVL 效应,并且能够及早地免疫重建。

在这方面已经有了一些不错的尝试。如利用偶联免疫毒素的 CD25 单抗,或通过识别 T 细胞早期活化抗原标记 CD69 来清除异基因反应性 T 淋巴细胞;给供体 T 淋巴细胞转染自杀基因,控制其增殖反应;通过阻断共刺激分子抑制 T 细胞活化;添加细胞因子从而改变 T 细胞的分化方向……,不一而足^[8]。但是这些方法也存在着许多缺陷,如对初始 T 细胞的影响;特异性不强或清除能力有限;操作及控制技术复杂等。

而一些对经典抗原呈细胞树突状细胞的新发现,为 GVHD 的防治提示了新的方向。

人们往往很难将 DCs 与免疫耐受联系起来,因为其众所周知的特征就是激发强烈的免疫应答。的确,成熟的 DCs 是已知最有效的抗原呈细胞。但 DCs 并非均是均质的,目前认为,在免疫耐受的形成过程中,某些 DCs 亚群起着枢纽的作用^[9]。因此 DC 向 T 细胞呈抗原可致两种不同结果:免疫刺激(免疫原性)或免疫抑制(耐受原性)。耐受亦或免疫,DC 在这个敏感的平衡中起着决定性的作用。

研究表明,基因修饰的 DCs 可以用来人工调控免疫反应,如 IL-10 和 TGF-β 等基因修饰的 DC 具有诱导免疫耐受的潜能。Munn、Terness 等^[4,8]发现,抗原呈细胞——包括巨噬细胞和树突状细胞——存在着某些特殊的类型,可以籍 IDO 的表达选择性地表现出免疫抑制性。

IDO 是一种含亚铁血红素的酶,是肝脏外唯一可以催化色氨酸分子中吡啶环的氧化裂解,从而成为沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶。色氨酸的缺乏可以使细胞功能受限^[10-12]。色氨酸是哺乳动物必须的氨基酸。即使是一些能够合成色氨酸的细菌,只要有可能也会从外界环境中摄取,因为色氨酸的合成是一个极其耗能的过程^[13-14,21-22]。

IDO 均特异表达在巨噬或树突状细胞上,表达于树突状细胞上的 IDO 具有重要的免疫调节功能^[15]。

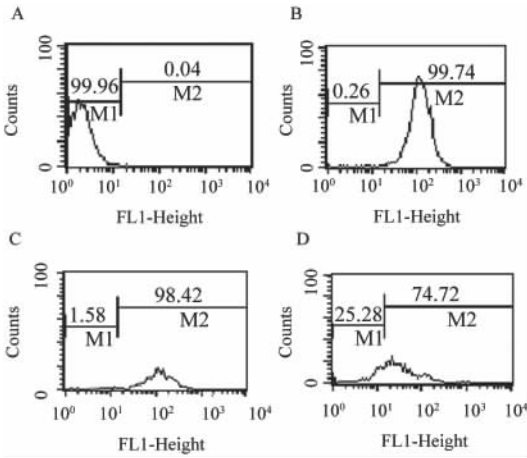


图 3 骨髓移植后嵌合细胞检测

Fig. 3 Engraftment detection after allo-BMT

A: Low engraftment detected in negative-control group 3 weeks after BMT; B: High engraftment detected in LacZ-DC group 3 weeks after BMT; C: High engraftment detected in IDO-DC group 3 weeks after BMT; D: Engraftment still can be detected in IDO-DC group 3 months after BMT

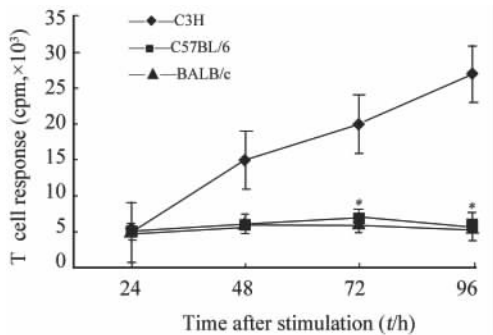


图 4 IDO-DC 特异性抑制 MLR

Fig. 4 IDO-DC inhibited alloreactive MLR

* $P < 0.05$ vs C3H

3 讨论

GVHD 是异基因造血干细胞移植的一个致命并发症,源于移植中的免疫活性 T 细胞对宿主同种

大量证据支持如下假说:某些表达 IDO 的 DCs 的特定亚群,能催化色氨酸的氧化分解代谢,在 T 细胞介导的免疫应答中扮演着关键角色^[16-18]。藉由 DCs 而表现出的、IDO 依赖性的 T 细胞抑制意味着缘于色氨酸分解代谢的生物化学改变对 T 细胞的增殖、分化、效应子作用和发育有着极深的影响^[19]。

本实验建立了小鼠 GVHD 模型,体外给受体来源的 DCs 转染 IDO 基因,并与供体骨髓移植植物共培养,从而选择性地清除了异基因反应性 T 细胞。致死剂量照射的受体鼠在接受经 IDO-DC 处理的供体骨髓移植后,没有出现明显的 GVHD 临床表现,而对照组则出现明显的 GVHD 反应,并多于 1 个月内死亡。病理表现与临床相符,对照组有明显的肝脏、皮肤、肠黏膜损害,而 IDO-DC 组则没有明显改变。FACS 检测 IDO-DC 治疗组在 3 个月时仍然保持比较高的供体细胞嵌合,说明供体骨髓成功植活。

本研究中设计用受体来源的小鼠树突状细胞(DCs),转染吲哚胺 2,3-二氧化酶(IDO)后体外与供体骨髓细胞移植植物混合培养,选择性清除引起 GVHD 反应的 T 淋巴细胞,并能及早地免疫重建。同时研究 IDO 修饰的 DCs 免疫后供体的免疫功能、特异性 T 细胞的凋亡情况,研究经过骨髓移植后 GVHD 的发生情况和宿主的免疫功能,为临床进行造血干细胞移植 GVHD 的处置提供实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO[J]. Trends Immunol, 2003, 24(5): 242-248.

[2] Mellor AL, Munn DH. IDO expression in dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(10): 762-774.

[3] Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon- γ , indoleamine 2, 3-dioxygenase, and tryptophan catabolism[J]. FASEB J, 1991, 5(11): 2516-2522.

[4] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism[J]. Science, 1998, 281: 1191-1193.

[5] Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, et al. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy[J]. Nat Immunol, 2001, 2(1): 64-68.

[6] Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection[J]. Int J Cancer, 2002, 101(2): 151-155.

[7] Uytendhove C, Pilotte L, Theate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. Nat Med, 2003, 9(10):

1269-1274.

[8] Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes [J]. J Clin Invest, 2004, 114(2): 280-290.

[9] Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1. Potentiates cancer chemotherapy [J]. Nat Med, 2005, 11(3): 312-319.

[10] Baban B, Chandler P, McCool D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific [J]. J Reprod Immunol, 2004, 61(2): 67-77.

[11] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self [J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 345-352.

[12] Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by selfreactive T cells [J]. Nature, 2005, 435(1042): 598-604.

[13] Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, et al. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells [J]. Trends Immunol, 2001, 22(7): 394-400.

[14] Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells [J]. J Exp Med, 2002, 195(6): 695-704.

[15] Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo* [J]. Immunity, 2003, 18(5): 605-617.

[16] Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, et al. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice [J]. Gastroenterology, 2003, 125(6): 1762-1773.

[17] Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, et al. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice [J]. J Exp Med, 2003, 198(1): 153-160.

[18] Hayashi T, Beck L, Rossetto C, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. J Clin Invest, 2004, 114(2): 270-279.

[19] Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation [J]. FASEB J, 2005, 19(10): 1347-1349.

[20] 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.

[21] von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, et al. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells *in vivo*: additional mechanisms of T-cell inhibition [J]. Blood, 2006, 108(1): 228-237.

[22] Basu GD, Tinder TL, Bradley JM, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances the efficacy of a breast cancer vaccine: role of IDO [J]. J Immunol, 2006, 177(4): 2391-2402.

[收稿日期] 2007-05-16

[修回日期] 2007-08-16

[本文编辑] 王莹