

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )06-0527-04

## *FasL* 基因修饰树突状细胞的抗白血病作用及其机制

王美玲<sup>1</sup>▲, 刘 峰<sup>1</sup>▲, 姜 斌<sup>1\*</sup>, 楼国良<sup>2</sup>, 张文颖<sup>1</sup>, 胡晓华<sup>1</sup>, 龚玉芳<sup>1</sup>, 袁海花<sup>1</sup>, 王炯轶<sup>1</sup> (1. 上海交通大学医学院附属第三人民医院 肿瘤科, 上海 201900; 2. 第二军医大学 附属长海医院 特需诊疗科, 上海 200433)

[ 摘 要 ] 目的: 选择性去除骨髓移植中异基因反应性淋巴细胞, 特异性抑制移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)并保留移植物的抗白血病(graft versus leukemia, GVL)作用。方法: 分别把未经处理的、溶 T 淋巴细胞处理的和以 *FasL* 基因修饰树突状细胞(*FasL*-DC)处理的 3 组小鼠骨髓细胞移植给已经接种 P815 肿瘤细胞的 BALB/c 受体小鼠, 然后观察比较各组小鼠存活情况, 并用<sup>51</sup>Cr 释放法检测移植后 2 个月受体小鼠 T 淋巴细胞的 CTL 活性。结果: 致死剂量(9 Gy)照射的白血病受体鼠在接受经 *FasL*-DC 处理的供体骨髓细胞移植后, 生存期显著延长, 2 个月时生存率为 40%, 对照组在 1 个月内全部死亡。<sup>51</sup>Cr 释放法检测证实, *FasL*-DC 处理组的 T 淋巴细胞对 P815 细胞保持较强的杀伤活性。结论: 转染 *FasL* 基因的 DC 可有效去除骨髓移植中异基因反应性 T 淋巴细胞, 移植用该方法处理过的骨髓, 不但能够有效抑制 GVHD 的发生, 同时也可以保留移植物的抗肿瘤作用。

[ 关键词 ] *FasL* 基因; 树突状细胞; 移植抗宿主病; 移植抗白血病; 骨髓移植

[ 中图分类号 ] R730.54; R733.7

[ 文献标志码 ] A

## Graft versus leukemia effect of *FasL*-modified dendritic cells and its mechanism

WANG Mei-ling<sup>1</sup>▲, LIU Feng<sup>1</sup>▲, JIANG Bin<sup>1\*</sup>, LOU Guo-liang<sup>2</sup>, ZHANG Wen-ying<sup>1</sup>, HU Xiao-hua<sup>1</sup>, GONG Yu-fang<sup>1</sup>, YUAN Hai-hua<sup>1</sup>, WANG Jiong-yi<sup>1</sup> (1. Department of Oncology, The Third People's Hospital of Shanghai, School of Medicine Shanghai, Jiaotong University, Shanghai 201900, China; 2. Department of Special Clinics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ Abstract ] **Objective:** To specifically inhibit the graft versus host disease (GVHD) and keep graft versus leukemia (GVL) effect of bone graft through selective deletion of alloreactive lymphocytes from haematopoietic stem cell grafts. **Methods:** BALB/c mice dendritic cells genetically engineered to express *FasL* were cultured with C57BL/6 mice stem cell grafts, and the pretreated stem cell grafts were used in a C57BL/6 to BALB/c mice GVHD/leukaemia model system (H-2<sup>b</sup>→H-2<sup>d</sup>). Untreated stem cells and those with T lymphocytes deleted were taken as controls. Then the survival of mice was observed and compared. <sup>51</sup>Cr release test was used to determine CTL activity of recipient mice 2 month after transplantation. **Results:** Mice receiving donor haematopoietic stem cell grafts pretreated with *FasL*-DC did not develop GVHD after lethal dose irradiation (9 Gy) and their survival period was greatly prolonged, with the survival rate being 40% after 2 months; mice in the control groups all died in 30 day. Result of <sup>51</sup>Cr release test showed that in *FasL*-DC group T cell had strong cytotoxicity on P815 cells. **Conclusion:** DC transfected with *FasL* gene can effectively remove alloreactive T lymphocytes in bone marrow graft. The bone marrow treated with this kind of technique can not only inhibit GVHD but also keep the GVL effect of haematopoietic stem cell grafts.

[ Key words ] *FasL* gene; dendritic cells; graft versus host disease; graft versus leukemia; bone marrow transplantation

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 527-530 ]

骨髓移植是治疗急慢性白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血等恶性疾病的有效方法。但是, 由于骨髓移植中存在大量的异基因反应性淋巴细胞, 可以导致同种异基因骨髓移植(allogeneic-bone marrow transplantation, alloBMT)发生严重的移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)<sup>[1-2]</sup>。

前期研究发现, 利用转染 *FasL* 基因的树突状细

[ 基金项目 ] 上海市科委登山计划( No. 06JC14054 ); 上海市教育委员会基金( No. 05BZ04 )。Supported by the Shanghai Science Committee Mountain Climbing Plan( No. 06JC14054 ); Foundation of Shanghai Education Committee ( No. 05BZ04 )

[ 作者简介 ] 王美玲( 1965- ), 女, 上海市人, 主治医师, 主要从事肿瘤治疗方面的研究; 刘 峰( 1974- ), 男, 山东省临沂市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究。▲两者共为第一作者

\* Corresponding author. E-mail: sunny91@126.com

胞(dendritic cells, DC),体外可以有效去除异基因反应性淋巴细胞<sup>[3]</sup>,并能够有效抑制实验小鼠的GVHD反应<sup>[4]</sup>。本研究在前期研究的基础上,利用肿瘤小鼠模型,进一步研究转染 FasL 基因修饰的树突状细胞(FasL-DC)保留移植物的抗白血病作用(graft versus leukemia, GVL)的有效性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

携带小鼠 FasL 基因的重组腺病毒 AdFasL 由本课题组构建,另文发表。 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  为 Amersham 公司产品;IL-4、IL-2、GM-CSF 为 R&D 公司产品;FITC 标记的抗 H-2K<sup>b</sup> 单抗及同型对照抗体为 Caltag Laboratories 产品。大鼠肥大细胞瘤 P815 细胞, MHC 类型是 H-2<sup>d</sup>, 购自中科院上海细胞所。

### 1.2 骨髓 DC 的培养及基因修饰

DC 培养参考 Inaba<sup>[5]</sup>的方法略作修改。取 BALB/c 小鼠骨髓培养 DC 细胞。收集培养至第 5 天的 DC,少量无血清培养液悬浮,按重复感染指数 50 加入 AdFasL,孵育 1 h 后再补足 RPMI 1640 和血清。24 h 后或其他适当时间收集,并用 RPMI 1640 洗 2 遍用于后续实验。AdFasL 转染后的 DC 记作 FasL-DC。培养至第 7 天未转染的 DC 记作 Day-7-DC。

### 1.3 实验动物及照射条件

近交系小鼠 BALB/c(H-2<sup>d</sup>)、C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) 购自上海西普尔-必凯实验动物中心,8~10 周龄,体重 20~22 g,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)2003-0002。C57BL/6 小鼠为骨髓移植供体,BALB/c 小鼠为受体,用直线加速器照射,总剂量 9 Gy。

### 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-NH<sub>4</sub>Cl 裂解红细胞,计数备用。骨髓细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液在 6 孔板中培养( $1 \times 10^7$  个/孔),同时分 3 组进行预处理:A 组,先后加入抗 Thy1.2 单抗和补体,然后进行离心洗涤;B 组,每孔加入  $2 \times 10^7$  个脾细胞;C 组,每孔加入  $2 \times 10^7$  个脾细胞,同时每孔加入  $1 \times 10^6$  个 FasL-DC 细胞。各组继续培养 48 h 后收集细胞计数备用。

### 1.5 肿瘤小鼠异基因骨髓移植以及分组

术前 5 d,受体 BALB/c 小鼠开始饮用含红霉素(250 mg/L)和庆大霉素(320 mg/L)的抗生素溶液进行肠道消毒准备。术前 2 d 受体 BALB/c 小鼠尾

静脉注射  $1 \times 10^6$  个 P815 细胞。骨髓移植当天,受体 BALB/c 小鼠接受一次性致死剂量全身照射 9 Gy。照射后的小鼠随机分 3 组(每组 10 只)。A 组(去 T 细胞骨髓移植组):照射后移植  $1 \times 10^7$  个经 T 细胞溶解处理的骨髓细胞移植物;B 组(不去 T 细胞骨髓移植组):照射后移植  $3 \times 10^7$  个未行特殊处理的骨髓细胞移植物;C 组(选择性去 T 细胞骨髓移植组):照射后移植  $3 \times 10^7$  个经 FasL-DC 处理的骨髓细胞移植物。骨髓移植当天记作第 0 天。

### 1.6 <sup>51</sup>Cr 释放法检测 CTL 活性

取移植后 2 个月 C 组小鼠脾脏制备 T 淋巴细胞悬液。正常 BALB/c(H-2<sup>d</sup>)、C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) 小鼠脾淋巴细胞和 P815 细胞以 30 Gy  $\gamma$  射线照射后用作刺激细胞,与反应细胞以 1:1 的比例在含有小鼠 IL-2(100 U/ml)完全培养液中继续培养,第 10 天收集存活的细胞作为效应细胞。用  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  ( $1.11 \times 10^7$  Bq)标记 BALB/c、C57BL/6 小鼠脾淋巴细胞和 P815 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  $\gamma$  计数器检测 cpm 值。均作 3 复孔,并设最大释放组和自然释放组。

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

### 1.7 统计学分析

使用 SPSS 10.0 软件包,生存期分析采用 Gehan 比检验。

## 2 结 果

### 2.1 FasL-DC 对小鼠生存期的影响

结果显示,经过 FasL-DC 预处理的 C 组小鼠生存期显著延长,2 个月生存率在 40% 左右;对照 B 组于 1 个月内全部死亡。实验组与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ , Gehan 比检验,图 1),说明 FasL-DC 处理的骨髓移植能够显著降低小鼠 GVHD 和肿瘤复发相关的病死率。

### 2.2 FasL-DC 保留骨髓移植物的 GVL

取移植后 2 个月受体 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞,检测其 CTL 作用。结果显示,FasL-DC 治疗组的 T 淋巴细胞对 P815 细胞仍然保持较强的杀伤活性,而对 C57BL/6、BALB/c 小鼠淋巴细胞的杀伤活性微弱,这表明 FasL 基因修饰的 DC 不但降低了 GVHD 风险,而且仍然保留了骨髓移植物的 GVL 作用(图 2)。

### 3 讨论

临床和实验上有许多方法可以较好地抑制 GVHD, 比如 T 细胞去除就是一个非常有效的方法, 但 EB 病毒和巨细胞病毒等的感染、移植物成活失败、肿瘤复发的概率都大大增加。所以最理想的方法是能够选择性清除移植物中 GVHD 反应性 T 淋巴细胞, 但保留能够特异性识别病毒、肿瘤和其他功能的 T 细胞。

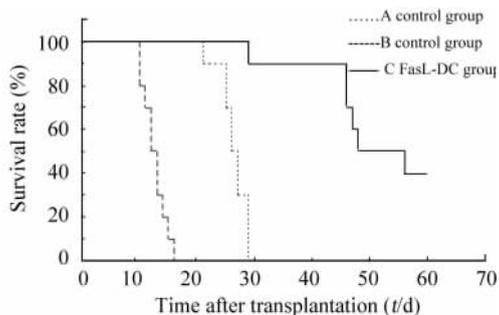


图1 FasL-DC 处理的骨髓移植能够有效降低小鼠 GVHD 和肿瘤复发相关的病死率

Fig.1 FasL-DC treated bone marrow graft obviously decreased GVHD and leukemia relapse related mortalities

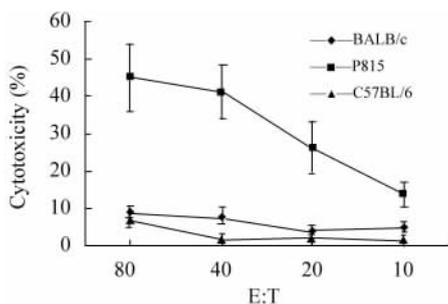


图2 FasL-DC 保留移植骨髓的抗白血病作用

Fig.2 FasL-DC reserves the GVL effect of bone marrow graft

Fas/FasL 介导活化诱导的细胞凋亡(activated induced cell death, AICD)在人和鼠都已被证明, 并被认为是外周 T 细胞耐受<sup>[6]</sup>以及免疫下调时清除活化的 T 细胞防止其过度增殖的重要机制<sup>[7]</sup>, 而且 AICD 诱导的抗原特异性细胞凋亡不会影响其他静息的 T 细胞。DC 是功能最强大的专职抗原提呈细胞, 而且可以激活初始型 T 淋巴细胞<sup>[8]</sup>。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>[9-10]</sup>。DC 某些亚群最高表达 FasL, 与其接触的 T 细胞不是被活化, 而是被清除<sup>[11-12]</sup>。模拟体内 AICD 及 FasL-DC 的生理机

制, 体外给受体来源的 DC 转染 FasL 基因, 并与供体骨髓细胞移植共培养, 体外有效地选择性清除了异基因反应性 T 细胞<sup>[3]</sup>, 体内有效抑制了 GVHD 效应 T 细胞的产生<sup>[4]</sup>。在以上工作的基础上, 利用小鼠肿瘤模型, 进一步验证了 FasL-DC 在抑制 GVHD 的同时保留 GVL 的作用。

本实验中小鼠采用异基因骨髓移植, 根据国内外大量的小鼠 GVHD 模型资料和本课题前期的工作, 如果骨髓细胞移植没有采取去 T 细胞等处理, 几乎无一例外会发生 GVHD, 而且, 急性 GVHD 如果不治疗, 一般于 2~3 周死亡<sup>[13-14]</sup>。本实验 A 组(对照组)小鼠移植了未去除 T 细胞的骨髓移植细胞植物, 发生了急性致死性 GVHD, 于 2~3 周死亡。该组因为保留了移植物中的 T 细胞, 又是异基因骨髓移植, 这些 T 细胞抗非同型 MHC 抗原肿瘤细胞的能力非常强, 一般不会因肿瘤复发死亡, 所以小鼠几乎全部是因急性 GVHD 死亡; 而 B 组(对照组)小鼠的骨髓细胞移植中的 T 细胞已经去除, 理论上 100% 不会发生 GVHD, 因为 GVHD 主要是由骨髓移植中的 T 细胞引起的。但是因为完全去除了 T 细胞, 结果导致了肿瘤细胞加速生长, 所以 B 组小鼠的死亡应该是由肿瘤急性复发引起的, 该组小鼠死亡时间多在 3~4 周; C 组(实验组)的骨髓细胞移植中的 T 细胞是经过 FasL-DC 处理的, 选择性地去除了引起 GVHD 的 T 细胞, 同时又保留了抗肿瘤作用的 T 细胞。所以 C 组小鼠既明显减轻了 GVHD, 又最大程度地保留了移植物抗肿瘤的作用, 生存时间远比对照组长。但应该说目前还没有真正的方法完全兼顾“既抑制 GVHD 又保留 GVL”, 本方法也只是部分做到了这一点。

结果表明, 与去除 T 细胞的骨髓移植组和没有经 FasL-DC 处理的骨髓移植组相比, 经过 FasL-DC 处理的骨髓移植组的小鼠具有明显的生存优势。这说明, 经过 FasL-DC 处理的骨髓移植组的小鼠, 不但有效抑制了急性 GVHD 的发生, 而且大大减少了肿瘤的复发, 有效地保留骨髓移植物的 GVL 作用。而体外实验与体内实验结果一致, 通过体外细胞杀伤实验观察到, C 组小鼠淋巴细胞仍然保留了对 P815 细胞较强的杀伤作用, 而对 BALB/c 小鼠淋巴细胞杀伤作用则很低。

本方法能够抑制 GVHD 并保留 GVL 作用, 主要在于利用了以下机制: DC 独有的强大的激活初始 T 细胞的能力<sup>[8]</sup>; 受体 DC 是启动 GVHD 反应的最重要的抗原提呈细胞<sup>[9]</sup>; DC 特异性识别 T 细胞的能力; Fas/FasL 途径的凋亡是体内调节 T 细胞增殖

平衡的重要机制<sup>[7]</sup>;体内本身就存在 DC-FasL 介导特异性 T 细胞凋亡的生理现象<sup>[11]</sup>。另外重要一点就是体外使用 FasL-DC 处理骨髓细胞移植,而不是体内使用 FasL-DC<sup>[15]</sup>。

综上所述,通过同种异基因体内体外反应模型和小鼠肿瘤模型,证实了课题最初的设想,FasL-DC 能够有效清除移植中 GVHD 反应性淋巴细胞,移植经过这种处理的骨髓不但能够有效抑制 GVHD 的发生,而且能够有效地保留骨髓移植物的 GVL 作用,较好地减少肿瘤的复发。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation[ J ]. *Blood*, 1990, 75 ( 3 ): 555-562.
- [ 2 ] Gaziev D, Polchi P, Galimberti M, *et al.* Graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for thalassemia: an analysis of incidence and risk factors[ J ]. *Transplantation*, 1997, 63( 6 ): 854-860.
- [ 3 ] 刘 峰,楼国良,李永梅,等. 选择性去除骨髓移植中异基因反应性淋巴细胞[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11( 2 ): 110-113.
- [ 4 ] 楼国良,刘 峰,李永梅,等. FasL 基因修饰的树突状细胞抑制 GVHD 的作用和机理[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12( 1 ): 28-32.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance[ J ]. *Immunity*, 1996, 4( 3 ): 321-328.
- [ 7 ] Lenardo M, Chan KM, Hornung F, *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment[ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 221-253.
- [ 8 ] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 271-296.
- [ 9 ] 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.
- [ 10 ] Nachbaur D, Kircher B. Dendritic cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[ J ]. *Leuk Lymphoma*, 2005, 46( 10 ): 1387-1396.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Chuang YH, Suen JL, Chiang BL. Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model of asthma[ J ]. *J Mol Med*, 2006, 84( 7 ): 595-603.
- [ 13 ] Sato K, Nakaoka T, Yamashita N, *et al.* TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse[ J ]. *J Immunol*, 2005, 174( 7 ): 4025-4033.
- [ 14 ] Delgado M, Chorny A, Ganea D, *et al.* Vasoactive intestinal polypeptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft versus host disease and leukemia relapse after bone marrow transplantation[ J ]. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1070: 226-232.
- [ 15 ] Kusuha M, Matsue H. Limitations of CD95 ligand-transduced killer dendritic cells to prevent graft rejections[ J ]. *Exp Dermatol*, 2005, 14( 4 ): 273-280.

[ 收稿日期 ] 2007 - 08 - 23

[ 修回日期 ] 2007 - 11 - 04

[ 本文编辑 ] 王 莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外),例如 *m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/(kg·d)或 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 A°(埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec);转速单位符号为 r/min(不是 rpm);量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N,也不是 mol/mm<sup>3</sup>);力的单位“牛顿”符号为 N(不是 dyn(达因)、kgf(千克力),换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N);热量单位“焦耳”符号为 J(不是 cal(卡)、kcal(千卡),换算 1 cal = 4.187 J);放射性活度单位符号为 Bq(不是 Ci(居里),换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq)。

(本刊编辑部)