

小鼠非清髓单倍体造血干细胞移植中脾细胞对植入及移植抗宿主病的影响

彭恩兰, 左红莉, 余长林*

(军事医学科学院附属医院血液科, 北京 100071)

[摘要] 目的: 采用小鼠非清髓单倍体造血干细胞移植移植抗宿主病(GVHD)模型, 将单倍体相合供鼠的骨髓细胞和脾细胞混合移植给受鼠, 探讨脾细胞数量对嵌合体形成及GVHD的影响。方法: 30只受鼠CB6F1(H2Kd/b)分为A、B、C组, 均接受⁶⁰Co 4Gy全身照射, 实验组4~6h后混合输入供鼠C57BL/6(H2Kb)脾细胞(依组次分别输注 1×10^7 , 3×10^7 , 6×10^7 个)和骨髓细胞(1×10^7 个)。测定受鼠嵌合体水平, 观察各组GVHD临床表现, 进行评分, 并观察生存期。结果: A及B组移植后3周达完全供者植入, C组于移植后2周达完全供者植入。A组小鼠未观察到GVHD表现, B组小鼠全部出现GVHD, 其中部分小鼠有严重GVHD, C组小鼠均出现严重GVHD。各组小鼠临床GVHD评分有显著差异(各组间 $P < 0.01$), 且C组 $>$ B组 $>$ A组。移植后全部存活超过90d。结论: 增加小鼠单倍体造血干细胞移植中脾细胞数量, 有利于促进尽早形成完全供者嵌合体, 但同时增加GVHD发生的可能性及严重程度。

[关键词] 小鼠; 非清髓; 单倍体造血干细胞移植; 移植抗宿主病; 嵌合体

[中图分类号] R457.7 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0155-05

Effects of different proportion of donor splenocytes on chimerism and GVHD after haploidentical MHC matched stem cells transplant with nonmyeloablative conditioning in murine model

PENG En-lan, ZUO Hong-li, YU Chang-lin*

(Department of Hematology, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of splenocytes on chimerism and GVHD after haploidentical MHC matched stem cells transplant with nonmyeloablative conditioning in murine model. **Method:** Thirty CB6F1 recipient mice were divided into group A, B and C. They were given ⁶⁰Co of total body irradiation and infused with MHC haploidentical matched bone marrow plus different proportion of splenocytes. The level of the chimerism of the recipient mice was detected by flow cytometry. The manifestations and histopathological examination of GVHD were observed. The mortality of the recipient mice was observed. **Result:** Engraftments of group A and B were full donor chimerism after 21 days, engraftments of group C were full donor chimerism after 14 days. The clinical GVHD score in group C was obviously higher than that in group B ($P < 0.01$), and that in group B higher than in group A ($P < 0.01$). All the mice survived over 90 days. **Conclusion:** The higher dose of MHC haploidentical matched splenocytes will help to be full donor chimerism earlier, but it may aggravate GVHD.

[Key words] murine; nonmyeloablative; haploidentical MHC matched stem cells transplant; GVHD; chimera

移植抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD) 是单倍体造血干细胞移植最主要的并发症

[收稿日期] 2010-01-08

[第一作者] 彭恩兰, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为血液病与造血干细胞移植, Tel: (010) 66947133, E-mail: pe10796@gmail.com

[通讯作者] * 余长林, 男, 博士, 副主任医师, 硕导, 研究方向为血液病的治疗, E-mail: fische1224@sohu.com.

之一。供者淋巴细胞是 GVHD 的主要效应细胞,其中 T 淋巴细胞最重要。增加移植物中淋巴细胞数,能促进形成完全供者植入,但 GVHD 发生率及严重程度也可能随之增加。在单倍体造血干细胞移植中,为了促进移植物的持久植活而又不发生严重的 GVHD,探讨移植物中合适的成熟淋巴细胞数量十分重要。本文通过建立小鼠非清髓单倍体相合造血干细胞移植 GVHD 模型,在输注单倍体相合小鼠定量骨髓细胞数量前提下,调整脾细胞输注剂量,观察脾细胞数量对嵌合体形成以及 GVHD 的程度的影响。

1 方法

1.1 实验动物 受鼠为 BALB/C × C57BL/6 杂交鼠 CB6F1(H2Kd/b),雌性,6~8 周龄,体重 17~24 g;合格证号 SCXK-(军)2007-004;供鼠为近交系 C57BL/6(H2Kb)小鼠,雄性,6~8 周龄,体重 18~22 g。供、受鼠均为 SPF 级,购于军事医学科学院实验动物中心,饲养在该中心层流架带盖鼠笼中,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 试剂和器械 PE-H-2Kd 及 FITC-H-2Kb 单克隆抗体购于美国 BD Phamingen 公司,小牛血清购于兰州民海生物工程有限公司,RPMI 1640 培养液购买于美国 Gibco 公司,检测嵌合体所用流式细胞仪(Epics XL 型)为美国 BECKMAN-COULTER 公司产品。

1.3 单倍体相合非清髓造血干细胞移植 受鼠移植前 3 d 开始饮用含庆大霉素的饮用水。⁶⁰Co 全身照射 4 Gy,剂量率 248.26 cGy·min⁻¹,照射后 4~6 h 经尾静脉输注供鼠骨髓细胞与脾细胞混合悬液。

1.4 供鼠骨髓与脾细胞的制备 供鼠断颈处死后,投入 75% 乙醇 500 mL 中,浸泡 2 min。无菌条件下采集 C57BL/6 小鼠股骨及脾脏。将股骨两端软骨剪去,露出红色的骨髓腔。用无菌注射器吸取含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液反复冲洗骨髓腔制成细胞悬液,过 4 号针头使之成为单细胞悬液。PBS 洗涤 2 次,计数并用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度为 1 × 10⁸ · mL⁻¹ 备用。脾脏经 200 目筛网研磨成单细胞悬液,采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,8.5 g · L⁻¹ NH₄Cl 裂解红细胞,PBS 洗涤 2 次,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度为 0.5 × 10⁸ · mL⁻¹ 备用。将脾细胞及骨髓细胞数调整为 1:1,3:1 及 6:1 备用,并用流式细胞

仪分别检测脾细胞及骨髓细胞中的细胞分类。

1.5 实验设计 受鼠根据所输脾细胞数不同随机分为 A、B、C 组及对照组,每组 10 只小鼠。每组平均体重无显著差异。A、B、C 组均经尾静脉输注移植物,每只小鼠除输注 C57BL/6 小鼠 1 × 10⁷ 个骨髓细胞外,A、B、C 组每只小鼠同时还输注 C57BL/6 小鼠脾细胞,数量依次是 1 × 10⁷,3 × 10⁷,6 × 10⁷ 个;对照组照射后不输注任何移植物。受鼠继续饲养在 SPF 级层流房中。所有受鼠均未给予 GVHD 防治措施。

1.6 观察指标 嵌合体的检测:分别在移植后 7,14,21,28,35,42,49,56,63,70,77,84 d 制备受鼠血液白细胞悬液,加入 PE-H-2Kd 及 FITC-H-2Kb 单克隆抗体,应用流式细胞术分析方法来确定受鼠白细胞中 MHC 单倍体相合供者来源的细胞比例。方法:取 EDTA 抗凝全血 50 μL 置于专用管中,每样品按 1 μg/10⁶ 细胞加入 PE-H-2Kb 和 FITC-H-2Kd 单抗,对照管加入 PE IgG₂ 和 FITC IgG₂ 单抗,充分混匀后置于 4℃ 冰箱避光反应 15~30 min,加入红细胞裂解液除去红细胞,1 000 r/min 离心 5 min,移去上清液,PBS 洗涤 2 次,加入 PBS 700 μL 重悬成单细胞悬液,上机检测。GVHD 观察:观察受鼠精神活动、眯眼、弓背、翘毛、皮肤改变、体重变化和每日大小便情况等。临床 GVHD 评分,根据小鼠移植后体重变化、弓背姿势、活动情况、翘毛、皮肤等情况评分。实验中 CB6F1 受鼠按计划输注骨髓细胞及脾细胞后,0 d 开始每日观察体重变化、弓背姿势、活动情况及毛发情况、皮肤状况,以评估临床 GVHD 发生情况,每只小鼠根据此表评分,得分 6 分或以上为严重 GVHD,具体标准参照国外相关文献的评分系统(见表 1)^[11]。病理检查:于移植后 2,3,4 周随机抽取 3 组小鼠各 1 只脱颈处死后取肝、小肠和皮肤组织,用 10% 甲醛液固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察^[2]。生存期监测:观察

表 1 小鼠移植后临床 GVHD 评分标准

标准	0 分	1 分	2 分
体重减轻	<10%	10%~25%	>25%
姿势	正常	静止弓背	严重弓背、影响活动
活动	正常	轻至中度减少	刺激后才活动
竖毛	正常	轻至中度竖毛	重度竖毛
皮肤	正常	皮皱	明显脱毛

小鼠生存期, 存活时间超过 50 d 为长期生存, 计算小鼠存活率。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包根据实验资料选用方差分析。计量参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 存活率以百分率表示。

2 结果

2.1 移植物流式细胞术检测 脾细胞分类结果:

Thy1.1⁺ 45.0%, B220⁺ 64.5%, CD3⁺/CD8⁺ 25.5%, CD3⁺/CD4⁺ 15.2%, CD4⁺/CD25⁺ 1.4%, NK1.1⁺ 7.19%, Gr-1⁺ 6.9%, MAC-1⁺ 7.73%, MAC-3⁺ 1.3%, Scal-1⁺/C-Kit⁺ 0.5%; 骨髓细胞分类结果: Thy1.1⁺ 6.7%, B220⁺ 25.6%, CD3⁺/CD8⁺ 1.9%, CD3⁺/CD4⁺ 1.4%, CD4⁺/CD25⁺ 0.9%, NK1.1⁺ 7.8%, Gr-1⁺ 60%, MAC-1⁺ 67.5%, MAC-3⁺ 8.2%, Scal-1⁺/C-Kit⁺ 0.6%。

2.2 嵌合体的检测 各组小鼠均在移植后 7 d 在受鼠外周血白细胞中检测到供者细胞, 其中 B 组及 C 组均为混合嵌合体, 即供者细胞所占比例 5% ~ 90%, A 组为微嵌合体即供者细胞所占比例 < 5%。

移植后 14 d 外周血白细胞中供者细胞所占比例, C 组为 (96.48 ± 0.51)%, 达到完全供者嵌合; B 组为 (86.32 ± 11.94)%, 介于混合嵌合及完全供者嵌合之间; A 组为 (71.90 ± 23.35)%, 为供受者混合嵌合; 移植后 21 d 复测嵌合率, C 组仍为完全供者嵌合, B 组 (93.22 ± 1.10)%, A 组 (92.02 ± 1.94)%, A 组及 B 组亦均达完全供者嵌合。移植后 84 d A 组为 (94.88 ± 1.43)%, B 组为 (94.64 ± 2.28)%, C 组为 (95.70 ± 2.64)%, 3 组小鼠嵌合率均为完全供者嵌合, 详见表 2。移植后 84 d 嵌合体稳定, 见图 1 ~ 2。综合结果显示, 移植后 14 d 时 C 组小鼠达完全供者嵌合, A 组及 B 组均为混合嵌合体, 移植后 21 d 时 3 组小鼠均达完全供者嵌合, 且持续稳定到移植后 84 d。

表 2 各组小鼠移植后嵌合体检测结果(%)

组别	14 d	21 d	84 d
A	71.90 ± 23.35	92.02 ± 1.94	94.88 ± 1.43
B	86.32 ± 11.94	93.22 ± 1.10	94.64 ± 2.28
C	96.48 ± 0.51	96.70 ± 1.34	95.70 ± 2.64

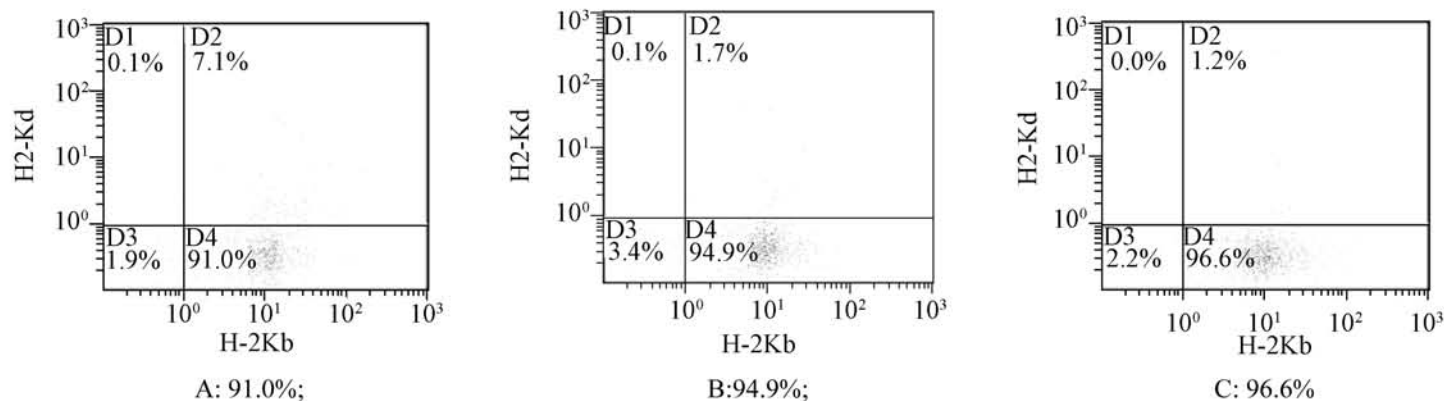


图 1 移植后 21 d 嵌合体的测定结果

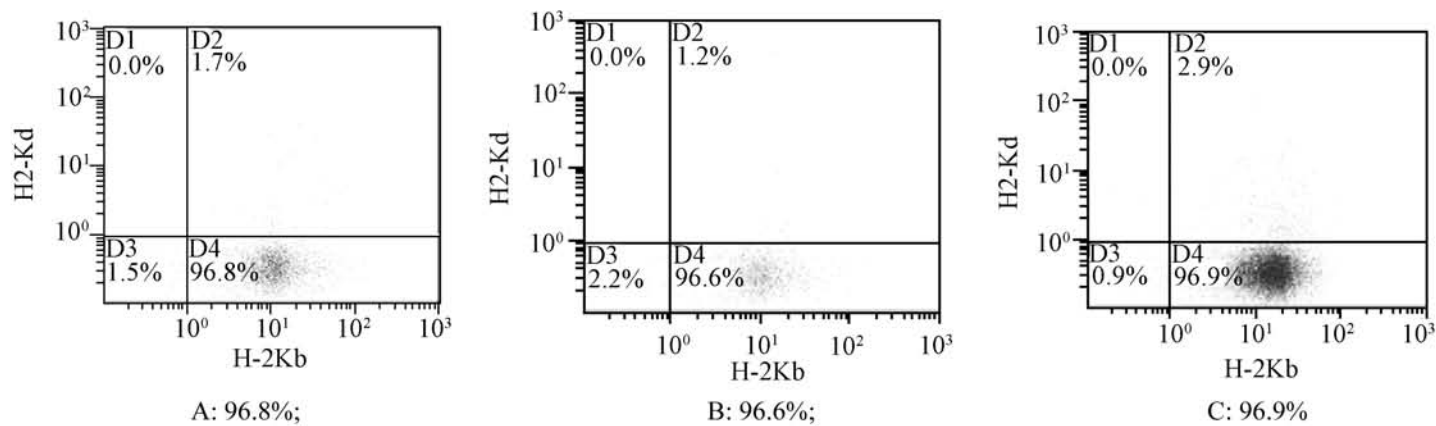


图 2 移植后 84 d 嵌合体的测定

2.3 GVHD 发生情况 GVHD 临床表现及评分:

对照组小鼠照射后出现精神萎靡, 体重逐渐减轻, 一周后症状好转, 体重逐渐增加, 但 10 d 内血象均自行恢复正常, 且均存活超过 90 d, 说明预处理方案是非清髓性。A, B, C 组小鼠均长期存活超过 90 d。A 组: 均未观察到临床 GVHD 表现, A 组 GVHD 临床

评分为 0.00 ± 0.00。B 组: 精神状态均欠佳; 其中 2/10 小鼠于 +21 d 后出现精神差, 活动少, 眯眼, 弓背, 翘毛, 体重逐渐减轻, 但未见脱毛、皮疹及腹泻; 4/10 小鼠呈眯眼状态, 体重均变化不大, 未观察到弓背、翘毛、腹泻、皮疹等表现; B 组 GVHD 临床评分为 2.40 ± 1.96。C 组: 移植后 18 d ~ 25 d (10/10),

C 组小鼠移植后出现精神差、活动少、眯眼、弓背、翘毛、体重减轻等 GVHD 表现,但未见脱毛、皮疹及腹泻;C 组临床 GVHD 评分为 5.33 ± 1.00 。GVHD 临床评分, C 组 > B 组 > A 组(各组间 $P < 0.01$)。体重变化:对照组及 3 个实验组小鼠均于照射后体重短暂下降,1 周内恢复基础体重,此后对照组小鼠体重一直呈增加趋势,平均体重增加明显;C 组移植 2 周后再次出现体重减轻,平均体重减轻较为明显,而 A 组及 B 组小鼠移植 1 周后体重总体为增加趋势,但体重增加不明显。各组小鼠体重变化比较见图 3,这提示实验组与对照组小鼠相比较,体重存在下降趋势。总之,A 组无临床 GVHD 表现,B 组均有不同程度的临床 GVHD 表现,且部分小鼠出现严重 GVHD 表现,C 组小鼠则均出现严重 GVHD 临床表现。

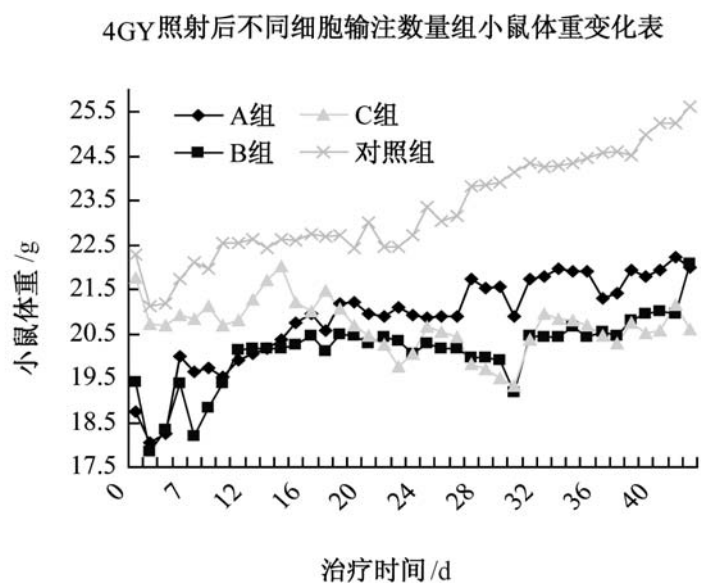


图 3 4GY 照射后不同细胞输注数量组及对照组小鼠体重变化

GVHD 病理结果:A 组肝脏病理切片可见部分中央静脉瘀血,主要病变为弥漫性肝细胞轻度肿胀,散在的中央静脉周围和汇管区明显的单核细胞和淋巴细胞浸润。B 组呈严重 GVHD 表现小鼠于 +30 d 予以脱颈处死,取肝、小肠和皮肤病理检查,肝脏病理检查结果呈局灶性肝细胞较明显肿胀,肝窦内见数量不等淋巴细胞浸润,部分汇管区显著的单核细胞和淋巴细胞浸润,并可见成纤维细胞增生。C 组出现临床 GVHD 表现后予以脱颈处死,取肝、小肠和皮肤病理检查,肝脏病理检查结果示肝细胞部分坏死,肝窦内见数量不等淋巴细胞浸润,汇管区及中央静脉显著的单核细胞和淋巴细胞浸润。3 组小鼠皮肤及小肠病理切片结果较对照组变化不大。A, B, C 3 组小鼠肝脏病理结果均明确了 GVHD 的存在,其中 A 组病理 GVHD 程度最轻, B 组居中, C 组最重,随着移植物中脾细胞数的增加,炎细胞浸润程

度加重伴肝细胞肿胀坏死程度加重。结合临床评分结果,笔者可以得出结论:造血干细胞移植中,所输脾细胞剂量越高,发生病理 GVHD 的程度更重。

2.4 生存期观察 观察 90 d,除实验中取病理需要处死部分小鼠外,3 个实验组及对照组小鼠自然存活率 100%。

3 讨论

非清髓性造血干细胞移植与传统的清髓性造血干细胞移植相比,由于减轻了预处理强度,移植后大部分形成完全供者嵌合,少部分形成部分嵌合性植入,相对减轻了 GVHD 的发生率。非清髓单倍体相合造血干细胞移植具有供体选择机会大、移植物抗白血病(GVL)效应强、复发率低等优点,但同时存在 GVHD 发生率高、免疫重建慢等缺点。临床上采用纯化 $CD34^+$ 造血干细胞移植(移植前去除移植物中的淋巴细胞)或部分去 T 淋巴细胞移植,在一定程度上减轻了 GVHD,但肿瘤的复发率增高^[3]。探讨移植物中合适的淋巴细胞成分是保留 GVL 效应、减少复发,和减轻 GVHD 的关键。

造血干细胞移植成功的标志和供者细胞在受者体内的植入(嵌合状态)的建立和发展有关。嵌合体一般分为 3 种类型:完全供者嵌合体(供者细胞所占比例 > 90%)、混合嵌合体(供者细胞所占比例 5% ~ 90%)和微嵌合体(供者细胞所占比例 < 5%)。研究显示,小鼠骨髓中 T 淋巴细胞含量仅为 2%,相当于去 T 细胞移植中,小鼠外周血中成熟 T 淋巴细胞诱导致命性 GVHD 的潜力是骨髓 T 细胞的 30 倍^[4],小鼠脾细胞中淋巴细胞含量高,其中 T 淋巴细胞约 30% ~ 40%,B 淋巴细胞约 55% ~ 60%,因此在移植的骨髓中加入脾细胞可以提升 T 细胞含量。有研究者在 H2 完全不相合小鼠非清髓骨髓移植中发现单纯增加供鼠骨髓量,并不能够提高供者骨髓植入率,而将含有约 35% T 淋巴细胞的供鼠脾细胞和骨髓一同输入受鼠,嵌合率水平明显提高^[5]。

本实验以小鼠为研究对象,在非清髓单倍体造血干细胞移植模型中,输注固定数量的单倍体供鼠骨髓细胞的同时,通过输注不同剂量小鼠脾细胞作为诱导 GVHD 的实验手段以观察脾细胞数量对嵌合体形成及 GVHD 的影响。实验中对照组小鼠 10 d 内血象均自动恢复正常,说明预处理方案为非清髓性。A 组所有受鼠移植后 1 周,外周血淋巴细胞中均测到单倍体供鼠源性细胞,均形成微嵌合体, B、C

组小鼠移植后 1 周均形成混合嵌合体。移植后 2 周, A 组受鼠均形成混合嵌合体, B 组则部分形成高比例混合嵌合体, 部分形成完全供者嵌合体, C 组均形成完全供者嵌合体。移植后 3 周 A、B、C 组均达到完全供者嵌合, 且移植后 12 周均仍稳定完全供者嵌合。结果提示: 从达到完全嵌合所需时间上看, 输注的脾细胞数越高, 越早形成完全供者嵌合; 从尽量减少输注淋巴细胞数量又能达到长期稳定植入的角度看, A 组 CB6F1 小鼠经⁶⁰Co 全身照射 4 Gy 后 4 ~6 h 经尾静脉输注单倍体相合的 C57BL/6 的 1×10^7 个骨髓细胞与 1×10^7 个脾细胞后即能达到长期稳定的完全供者嵌合。此结果提示临床上为了达到完全植入, 亦需要控制移植物中的淋巴细胞数量。

从临床 GVHD 表现及评分来看, A 组无临床 GVHD 表现, B 组则部分出现严重 GVHD, 部分仅轻微 GVHD 表现。C 组均有严重 GVHD 表现, 各组间临床评分有显著差异 ($P < 0.01$)。且总的来看: A 组 $<$ B 组 $<$ C 组。肝脏病理提示炎性细胞浸润程度也有类似结果: 效应上 A 组 $<$ B 组 $<$ C 组。值得注意的是, A 组无临床 GVHD 表现, 但是已有肝脏病理 GVHD 结果。C 组临床 GVHD 表现最严重, 相应的肝脏病理改变出现了肝细胞坏死。

上述结果提示: 从诱发 GVHD 的角度看, 小鼠非清髓单倍体造血干细胞移植时, 移植物中脾细胞剂量越高, 出现严重 GVHD 的发生率越高, 且程度更重。本实验中流式细胞仪分别检测脾细胞及骨髓细胞中的细胞分类结果显示脾细胞中总 T 淋巴细胞比例为 45.0%, 而骨髓细胞中总 T 淋巴细胞比例为 6.7%。脾细胞中 T 淋巴细胞以成熟 T 淋巴细胞为主, 供者来源成熟淋巴细胞是发生 GVHD 的主要效应细胞, 从尽可能减轻 GVHD 的角度出发, 应减少移植物中淋巴细胞的含量, 本文 3 个实验组中, A 组移植物中 1×10^7 个骨髓细胞合并加入 1×10^7 个脾细胞是较好选择。

总之, 实验结果显示小鼠单倍体造血干细胞移

植中, 一方面移植物中小鼠脾细胞输注剂量越大, 完全供者嵌合体形成的时间越早, 但 GVHD 的出现时间也越早, 且程度更重; 另一方面移植物中脾细胞输注剂量越小, 其混合嵌合体持续时间越长, GVHD 发生程度更轻甚至观察不到临床 GVHD 表现。这说明控制单倍体相合造血干细胞移植物中小鼠脾细胞输注剂量对避免发生严重的 GVHD 具有实际意义。本实验通过混合输注单倍体供鼠骨髓细胞及不同剂量脾细胞, 发现恰当的单倍体供鼠脾细胞输注数量既可避免发生严重的 GVHD 的基础上, 又可诱导持久稳定植入, 但如何能同时加强 GVL 效应仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kenneth R C, Lester K, Thomas R M, *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. the roles of minor H antigens and endotoxin [J]. *Blood*, 1996, 8(8): 3230.
- [2] Nagler A, Ohana M, Alper R, *et al.* Induction of oral tolerance in bone marrow transplantation recipients suppresses graft-versus-host disease in a semiallogeneic mouse model [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2003, 32: 363.
- [3] Liang-Pniu K, Nelson J C. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors: A review [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 40(1): 20.
- [4] Margalit M, Ilan Y, Ohana M, *et al.* Adoptive transfer of small numbers of DX5t cells alleviates graft-versus-host disease in a murine model of semiallogeneic bone marrow transplantation: a potential role for NKT lymphocytes [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2005, 35: 191.
- [5] Masak K, Yoshinori I, Shin M, *et al.* An irradiation free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T cell number and the intensity of conditioning [J]. *Transplantation*, 2005, 80(9): 1145.