

供受体混合骨髓移植 GVHD反应的动物实验研究

毕可红¹, 任海全², 朱传升¹, 王 岩¹, 刘秀兰¹, 唐天华², 马庆恒²

中图分类号: R818 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)03-0262-02

【摘要】 目的 观察混合骨髓移植的 GVHD反应。方法 以急性放射病 BALB/C小鼠(H-2d)为受鼠, C57BL/6(H-2b)小鼠为供鼠。供体鼠骨髓和脾细胞中混合一定比例的受体鼠脾脏细胞, 进行混合骨髓移植。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, 观察混合骨髓移植方式的 GVHD反应。结果 异基因骨髓移植组发生明显的 GVHD反应。供受鼠脾脏 3:1 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 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; 混合; GVHD反应

Study on GVHD of mixed Bone Marrow Transplantation in Experimental Animal Models. BIK E-hong, REN Hai-quan, ZHU Chuan-sheng et al. Shandong Qianfoshan Hospital, Jinan 250014 China.

【Abstract】 Objective To observe GVHD reaction in mixed BMT. Methods BALB/C mice with acute radiation disease were used as recipient mice models. C57BL/6 mice were taken as donor mice. C57BL/6 mice bone marrow and spleen cells mixed with certain percent of syngeneic spleen cells were underwent mixed BMT to observe their death rate, hematopoietic recovery of WBC lineage, spleen node count, mixed lymphocyte reaction in vivo, chimerism and pathological changes. Results GVHD was relatively strong in non-mixed BMT groups, the group mixed by 3:1 BMT after activation could not alleviate GVHD, whereas the mixed by 1:1 BMT group or by 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 CFU formation by the alleviation of mixed lymphocyte reaction in vivo as well as by the increase of chimeric rate. Conclusion Mixed BMT could lower the GVHD reaction, which was related to the ratio of syngeneic to allogeneic spleen cells.

【Key words】 Mixed BMT; GVHD; Mice

异基因骨髓移植 (Allo-BMT) 是治疗或治愈白血病或 MDS 等患者的重要手段^[1]。随着其予处理和移植方案的改进, 以及辅助药物的应用, 已使约 50% 患者获得长期治愈存活。但其最大的障碍仍是移植抗宿主病 (GVHD), 并成为移植相关死亡的主要原因^[2]。多数实验结果已证明去除供体骨髓中 T 细胞可以减少 GVHD 反应, 但随后发现白血病的复发率和移植失败率也明显升高^[3,4]。进一步证明其归因于异基因骨髓中的 T 细胞的去除, 因为它是移植抗白血病 (GVL) 的主要效应细胞^[5]。因此, 如何选择既减轻 GVHD 反应又同时保留 GVL 作用的方法, 成为国内外学者关注和研究的热点之一。本研究探讨了混合骨髓移植减少 GVHD 反应的实验, 并取得了初步结果。现具体报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 BALB/C 小鼠 (H-2d), 18~20 只, 雄性。C57BL/6 小鼠 (H-2b), 18~20 只, 雌性 (中国医学科学院动物中心提供)。辐照受鼠: ⁶⁰Co 照射剂量率为 10 cGy/总剂量 8.0 Gy 于山东省农科院辐射中心进行。

1.2 骨髓移植及分组 异基因移植组: 将 C57BL/6 鼠脾细胞与骨髓细胞按 5×10⁶ 与 1.0×10⁷ 比例经尾静脉注入 BALB/C 小鼠 (H-2d) 体内; 供受体鼠脾细胞 1:1 混合组 (以下称混合 1:1 组); 5×10⁶ 供受体 1:1 混合脾细胞与 C57BL/6 鼠骨髓细胞 1.0×10⁷ 移植给 BALB/C 小鼠; 供受体鼠脾细胞 2:1 混合组 (以下称混合 2:1 组); 供受体 2:1 混合脾细胞 5×10⁶ 与 C57BL/6 鼠骨髓细胞 1.0×10⁷ 移植给 BALB/C 小鼠 (H-2d);

供受体鼠脾细胞 3:1 混合组 (以下称混合 3:1 组); 供受体 3:1 混合脾细胞 5×10⁶ 与 C57BL/6 鼠骨髓细胞 1.0×10⁷ 移植给 BALB/C 小鼠 (H-2d)。

1.3 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 和 21 d 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 7μg/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 1 000 r/min 10 min 低速处理, 吸取上清液, 加入预温 37℃ 的 0.075 M KC 溶液中。37℃ 静置 20 min 加入 1% 醋酸: 甲醇固定液 1 ml 吹打均匀, 1 000 r/min 10 min 弃上清液, 加固定液 10 ml 吹匀, 置 15 min 重复固定一次, 末次离心后, 弃上清。留下固定液 0.5~1 ml 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 12 d 拉颈处死小鼠, 取出整体脾脏, 立即放入 Bouin 氏液中固定, 半个小时后, 解剖镜下计数脾结节。⑦体内混合淋巴细胞培养。移植后 4 d 经腹腔注射 ¹²⁵I-UdR [3.7×10⁴ Bq (2μCi)] 8h 后拉颈处死小鼠, 取脾脏放入 70% 乙醇中, 浸泡 3 d 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 ¹²⁵I-UdR 标准 cpm/min 并以脾脏重量更正。

2 结果

2.1 GVHD 反应 混合 1:1 组与 2:1 组 GVHD 反应较轻, 以弓背体位及腹泻为主, 异基因组和混合 3:1 组的 GVHD 反应明显。脱毛现象发生率分别为 35% (7/20) 和 30% (6/20), 轻度弓背体位发生率分别为 40% (8/20) 和 35% (7/20), 大便次数增多及便稀现象的发生率分别为 30% (6/20) 和 25% (5/20)。两组间的发生率无明显差别。异基因组、混合 1:1 组、混合 2:1

作者单位: 1 山东大学医学院 山东大学教学医院千佛山医院血液科, 山东 济南 250014 2 山东医学科学院血液肿瘤研究室
作者简介: 毕可红 (1963-), 女, 山东威海人, 主任医师, 从事血液病防治研究。

组及混合 3:1 组的 30d 死亡率分别为 50% (10/20)、15% (3/20)、25% (5/20) 和 45% (9/20) 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, 异基因组、混合 3:1 组为 GVHD II 级反应, 混合 1:1 组和 2:1 组为 GVHD Ⅲ 级反应。

2.3 受体鼠外周血白细胞的变化 经过受体鼠外周血白细胞的变化, 以混合 1:1 组恢复最高, 混合 2:1 组次之, 异基因组和混合 3:1 组的恢复水平较上述两组为低。说明异基因与同基因

脾细胞 1:1 和 2:1 的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。结果如表 1 所示。

2.4 受体鼠骨髓 GM-CFU 的变化 受体鼠接受不同骨髓移植后, 均有较高水平的 GM-CFU 生成率。其中以混合骨髓移植 1:1 组和 2:1 组恢复为较高, 两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。异基因对照组及混合 3:1 组的白细胞较低。具体结果参见表 1 所示。

2.5 GM-CFU^c 及外周血细胞测定 (表 1)

表 1 BMT 后 GM-CFU^c 及外周血细胞测定

分组	n ¹⁾	第 7 天		第 14 天		第 21 天	
		WBC ($\times 10^9$)	CFU-GM (集落 / 10^5)	WBC ($\times 10^9$)	CFU-GM (集落 / 10^5)	WBC ($\times 10^9$)	CFU-GM (集落 / 10^5)
异基因组	10	0.35 ± 0.05	25.2 ± 2.7	0.82 ± 0.22	49.0 ± 5.3	4.12 ± 0.39	53.0 ± 6.6
混合 1:1	10	0.53 ± 0.04	32.1 ± 5.2	1.21 ± 0.16	69.0 ± 7.3	7.28 ± 0.47	84.0 ± 6.2
混合 2:1	10	0.48 ± 0.05	33.0 ± 3.9	1.17 ± 0.13	65.0 ± 5.2	7.17 ± 0.33	80.4 ± 6.5
混合 3:1	10	0.36 ± 0.04	24.6 ± 3.9	0.88 ± 0.18	46.0 ± 6.2	4.76 ± 0.42	51.7 ± 5.8
对照	10	10.7 ± 0.64	106.0 ± 7.6	10.3 ± 0.67	107.0 ± 9.2	11.2 ± 0.57	112.0 ± 8.7

注: 1) n 为实验动物数。

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, 异基因组、混合 1:1、2:1、3:1 组的脾脏结节数分别为 (45.6 ± 7.6) 脾膈面、(124.5 ± 15.6) 脾膈面、(116.5 ± 31.2) / 脾膈面、(56.3 ± 15.2) 脾膈面。从受体鼠脾脏结节的计数结果发现, 混合 1:1 组和 2:1 组结节数较高, 与异基因组和混合 3:1 组比较, 并具有明显的统计学意义 ($P < 0.05$)。说明混合 1:1 和混合 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 ¹²⁵I-UdR 摄入试验表明混合 1:1 组和 2:1 组的脾淋巴细胞反应较弱。异基因组和混合 3:1 组体内混合淋巴细胞反应较强。按脾脏 ¹²⁵I-UdR 摄取率 (%) = (脾脏细胞计数 - 本底) / (标准计数 - 本底) × 100% 计算。移植 6d 后, 异基因组、混合 1:1、2:1 和 3:1 组 ¹²⁵I-UdR 摄取率分别为 (0.61 ± 0.10)%, (0.16 ± 0.04)%, (0.21 ± 0.04)% 和 (0.57 ± 0.05)%。

3 讨论

近年来, 急性白血病的异基因骨髓移植 (ALLO-BMT) 的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 (MHC) 屏障的存在, 使移植排斥病 (GVHD) 成为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^[1]。其中在机理研究方面已获得较肯定结果, 即 GVHD 反应与供者的 T 细胞有关。骨髓移植后, 供者的 T 细胞识别受体主要组织相容性抗原系统, 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^[6]。其中自然杀伤细胞也可以参与 GVHD 的病理过程。GVHD 是全身性疾病, 但以皮肤、肝脏及消化道受累为最常见。

正因为 GVHD 关系到 ALLO-BMT 的成功与否, 所以, 国内外学者根据 GVHD 反应的发生机制, 在如何防止 GVHD 方面进行了较多的探索与实验^[3,4], 并取得了某些进展。如经过单克隆抗体等方法清除移植骨髓中的 T 细胞的方法^[1]。虽然较多的实验结果证实该方法的确可以减少或者消除 GVHD 反应, 但伴随移植治疗白血病失败或复发率升高的事实又不支持单纯清除 T 细胞的移植方式^[3,4]。经过进一步的研究与尝试, 证实少量多次骨髓移植^[7]及混合骨髓移植^[8,9]等方法可以不同程度的减轻 GVHD 反应。

本实验在证实活化半相合骨髓移植减轻 GVHD 反应基础上, 又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^[9], 进行混合骨髓移植。结果表明作为对照的异基因骨髓移植组发生明显 GVHD 反应, 混合 1:1 组和混

合 2:1 组 GVHD 反应明显减弱。具体表现为混合 1:1 组和混合 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^[8]。因此, 研究结果初步表明供受体活化脾细胞在一定合适比例下, 可以明显的减少移植排斥反应。至于此种移植方式的抗白血病作用, 需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 异基因骨髓移植专题笔谈. 异基因骨髓移植治疗血液病 [J]. 中华血液学杂志, 1992, 13(11): 594
- [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排斥病的研究 [J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(10): 521-523
- [3] BUTLURNIA GALE R P 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
- [5] SYKES M HARTY M W SZOT G L IL-2 inhibits graft versus host disease promoting activity of CD4+ cells while preserving CD4 and CD8 mediated graft versus leukemia effects [J]. Blood 1994, 83: 2560-2569
- [6] GALE R P Graft-versus-host disease [J]. Immunol REV 1985, 88: 193
- [7] 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: 634-637
- [8] ILASTIS D ST WREN S M BILESTONE J A Effects of selective T cell depletion of host and/or donor bone marrow on Bmphopoietic repopulation tolerance and graft-versus-host disease on mixed allogeneic chimeras (B10 + B10D2 → B10) [J]. J Immunol 1996, 136: 28-33.
- [9] 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: 418-421