

·基础研究·

## 全不相合与全相合骨髓细胞在致敏模型的归巢与植入

许吕宏, 方建培\*, 翁文骏, 叶启翔  
(中山大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨全不相合与全相合供者骨髓细胞在致敏模型的归巢与植入情况。【方法】以转基因脾细胞输注致敏的BALB/c小鼠作为移植受者,致敏模型经8 Gy <sup>60</sup>Co照射后分别经尾静脉移植 $1 \times 10^7$  C57BL/6或BALB/c供者的骨髓细胞。予CFSE标记供者骨髓细胞,并分别在移植后不同时间点(2、12及48 h),通过病理切片及组织细胞悬液动态示踪供者细胞在致敏受者各组织的分布。移植后记录各组的生存情况,每周监测造血重建与骨髓恢复情况。【结果】归巢实验表明C57BL/6骨髓细胞在致敏受者股骨分布随时间推移先增加而后减少,在脾脏的分布随时间推移呈进行性减少。BALB/c骨髓细胞在致敏模型股骨及脾脏的分布均随时间推移而增加。接受C57BL/6骨髓细胞的致敏模型于移植第12~15天内全部死亡,血象及骨髓象呈进行性下降;而接受BALB/c骨髓细胞的能长期存活,血象及骨髓象能迅速恢复。【结论】全不相合的供者骨髓细胞在致敏模型中完全被排斥,而全相合供者的骨髓细胞能在致敏模型中进行有效的归巢与植入。

**关键词:**骨髓移植;致敏模型;植入;归巢

中图分类号:R457 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2011)05-0561-05

## Homing and Engraftment of Bone Marrow Cells from Fully Disparate or Identical Donor in a Sensitized Model

XU Lü-hong, FANG Jian-pei\*, WENG Wen-jun, YE Qi-xiang

(Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate homing and engraftment of bone marrow cells (BMCs) from fully disparate or identical donor in a sensitized model. 【Methods】 Sensitized BALB/c mice established by allogeneic splenocytes transfusion were used as transplanted recipients. After 8 Gy of <sup>60</sup>Co irradiation, the sensitized mice were received  $1 \times 10^7$  C57BL/6 BMCs from C57BL/6 or BALB/c donor via tail vein. A homing assay was also performed by labeling donor cells with the cell tracker, CFSE. Frozen sections and cell suspensions from different tissues were analyzed at different time points (2, 12, and 48 h post transplantation). Survivals were assessed post transplantation, and hematopoietic recovery was monitored weekly. 【Results】 Homing study showed BMCs from C57BL/6 had temporary increase in femur of sensitized recipient, but decreased later, and the BMCs decreased with time in spleen of sensitized recipients; while BMCs from BALB/c increased with time in femur and spleen of sensitized recipients. The sensitized mice received BMCs from C57BL/6 died between 12 to 15 days after transplantation, and hematopoietic recovery decreased with time; while the sensitized mice received BMCs from BALB/c got long-term survival, and hematopoiesis recovered rapidly. 【Conclusion】 BMCs from a fully disparate donor were totally rejected in the sensitized model, while the BMCs from a fully identical donor got successful homing and engraftment in the sensitized model.

**Key words:** bone marrow cells; sensitized model; engraftment; homing

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):561-565]

临床研究发现,在实体器官移植或造血干细胞移植前不少患者由于多次接受同种异基因输血

而受致敏,而高敏患者发生移植排斥的风险明显增加<sup>[1]</sup>。然而造血干细胞移植与实体器官移植亦

收稿日期:2011-04-17

基金项目:国家自然科学基金(30872383);广东省自然科学基金(9151008901000111);高等学校博士学科点专项科研基金(20090171110064);广东省医学科研基金(B2010086)

作者简介:许吕宏,博士,主治医师,讲师,研究方向:小儿血液系统疾病;\*通信作者,方建培,教授,博士生导师, E-mail:jpfang2005@163.com

有所不同,输注的造血干细胞循环于血液系统中,与致敏受者体内的免疫细胞及抗体接触的机会更多而更易被损伤,如何促进造血干细胞在致敏受者的植入是目前全球亟待解决的问题<sup>[2]</sup>。研究发现输血致敏的主要因素之一是血液含异基因白细胞,本课题组利用异基因脾细胞输注方法建立了致敏动物模型<sup>[3]</sup>。本实验拟研究全不相合与全相合供者骨髓细胞在致敏受者的归巢及植入情况,以明确致敏受者产生移植排斥的机制,为提高造血干/祖细胞在致敏受者的植入提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及主要试剂

无特定病原体(SPF级)的C57BL/6(H-2D<sup>b</sup>)及BALB/c(H-2D<sup>d</sup>),均为雄性,6~8周,体质量18~20g,由中山大学实验动物中心提供并饲养。羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)购自美国Invitrogen公司,甲基纤维素半固体培养基(Methocult™GFM3434)购自美国Stem Cell公司,RPMI-1640培养基购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 致敏模型与骨髓移植

参照文献<sup>[3]</sup>建立致敏动物模型,以C57BL/6脾细胞作为刺激源,BALB/c作为致敏受者。分离C57BL/6脾细胞,分别于移植前14d及7d通过尾静脉将 $1 \times 10^6$  C57BL/6脾细胞输注到BALB/c。致敏模型于移植5d开始饮用抗生素的饮用水,含庆大霉素 $32 \times 10^4$  U/L和红霉素250 mg/L。移植前予<sup>60</sup>Co照射,总剂量为8 Gy。分离C57BL/6或BALB/c小鼠的股骨及胫骨中骨髓细胞,洗涤后用RPMI-1640培养基将细胞浓度调为 $5 \times 10^7$ /mL,于照射后4h经尾静脉注射0.2 mL( $1 \times 10^7$ )到致敏BALB/c小鼠。接受不同供者来源的致敏小鼠每组25只,同时取单纯照射未移植的致敏小鼠10只作为空白对照组。

### 1.3 归巢的观察指标

1.3.1 CFSE标记供者细胞 分离供者C57BL/6或BALB/c小鼠骨髓细胞后,以红细胞裂解液溶解红细胞,应用PBS缓冲液将其浓度调整为 $(1 \sim 5) \times 10^7$ /mL,加入终浓度10  $\mu$ mol/L的CFSE,置于37℃孵育10 min后,再与5倍体积分含100 mL/L小牛血清的冷RPMI-1640完全培养液于-20℃孵育5 min以结束染色。应用PBS缓冲液洗涤细胞3

次,RPMI-1640完全培养液调整细胞浓度,然后将细胞移植到受鼠体内进行示踪检查。

1.3.2 病理切片示踪 分别于移植后第2、12及48 h处死致敏受者,取其眼静脉血进行涂片,并取股骨、脾脏、肝脏及肺脏行冰冻切片,并于荧光显微镜下计数每个视野中荧光细胞数( $\times 100$ )。结果判定标准为<sup>[4]</sup>:(-)未发现绿色荧光;(+)每个视野中仅发现1~5个阳性细胞;(++)每个视野中仅发现6~10个阳性细胞;(+++每个视野中仅发现11~100个阳性细胞。

1.3.3 流式细胞仪检测 同时于上述时点制备致敏模型的脾脏、股骨细胞悬液及眼静脉血,以Tris-NH<sub>4</sub>Cl溶液溶解红细胞,流式细胞仪检测绿色荧光的频率(激发光波长为488 nm)。

### 1.4 植入的观察指标

1.4.1 生存分析 移植后每日观察致敏模型的生存状况,记录死亡时间,绘制生存曲线。濒死动物取肝、肺、脾、肠管、足垫皮肤等组织作病理检查。

1.4.2 外周血象恢复 移植后每周从致敏模型尾静脉采血20  $\mu$ L,并用KX-21血细胞计数仪(日本Sysmex公司)检测外周血白细胞、血红蛋白及血小板等。

1.4.3 骨髓细胞恢复 移植后每周分离致敏模型的股骨,计数每根股骨中骨髓细胞的数量;并取 $2 \times 10^4$ 骨髓细胞置于1 mL甲基纤维素半固体培养基体系进行集落培养,在37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养7 d,计数CFU-GM,以细胞数多于40个为一集落。

### 1.5 统计分析

采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 $t$ 检验或单因素方差分析;绘制Kaplan-Meier生存曲线并进行Log-rank检验,检验水准设 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 组织切片显示供者骨髓细胞在致敏模型的归巢情况

体外实验表明CFSE荧光染料标记骨髓细胞在48 h内其荧光强度无明显改变,适用于体内动态示踪研究。如表1所示,血涂片及组织冰冻切片显示骨髓细胞的归巢情况,结果表明不同供者来源的骨髓细胞在致敏模型的归巢有明显差异。移

表1 血涂片和组织冰冻切片中供者细胞荧光频率分布

Table 1 Intensity of fluorescent events in frozen sections and blood smears

(n = 5)

Time	C57BL/6 donor group					BALB/c donor group				
	Liver	Lung	Blood	Femur	Spleen	Liver	Lung	Blood	Femur	Spleen
2 h	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+	+	+++
12 h	++	++	+	++	++	++	++	+	++	+++
48 h	+	+	-	+	+	+	+	+	+++	+++

植后第2小时,C57BL/6供者组的骨髓细胞主要位于致敏模型的肝、肺及脾等组织,而随时间推移此供者细胞在上述组织的分布明显减少;移植的第12小时,C57BL/6供者骨髓细胞在受者股骨的分别有所增加,但第48小时发现此骨髓细胞在股骨的分布有减少趋势。BALB/c供者组的骨髓细胞在致敏受者肝及肺的分布情况与C57BL/6供者组的相似,然而在脾脏的分布随时间推移并无减少;并且此供者骨髓细胞在致敏受者股骨的分布随时间推移能逐渐增加。

## 2.2 流式检测供者骨髓细胞在致敏模型的归巢情况

应用流式细胞仪检测供者细胞在各组织细胞悬液的分布频率亦证实了上述供者骨髓细胞在致敏模型的归巢情况。如表2所示,移植后第2小时,BALB/c供者骨髓细胞在受者外周血及股骨的分布与C57BL/6供者组的无明显差异,但在脾脏的分布是C57BL/6组的1.05倍( $P < 0.05$ )。移植后第12小时,BALB/c供者细胞在受者外周血、股骨及脾脏的分布分别是C57BL/6组的7.2倍( $P < 0.01$ )、1.04倍( $P < 0.05$ )、2.99倍( $P < 0.01$ )。移植后第48小时,BALB/c供者细胞在受者外周血、股骨及脾脏的分布分别是C57BL/6组的58倍( $P < 0.01$ )、3.57倍( $P < 0.01$ )、55.32倍( $P < 0.01$ )。

表2 流式细胞仪检测供者骨髓细胞在致敏模型各组织的归巢

Table 2 Homing of donor bone marrow cells in organs of recipients tested by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ , %, n=5)

Time	C57BL/6 donor group			BALB/c donor group		
	Peripheral blood	Femur	Spleen	Peripheral blood	Femur	Spleen
2 h	0.45 ± 0.08	2.21 ± 0.07	3.73 ± 0.13	0.54 ± 0.12	2.25 ± 0.14	3.93 ± 0.16 <sup>1)</sup>
12 h	0.15 ± 0.03	2.91 ± 0.08	2.10 ± 0.06	1.08 ± 0.06 <sup>2)</sup>	3.04 ± 0.08 <sup>1)</sup>	6.28 ± 0.15 <sup>2)</sup>
48 h	0.03 ± 0.01	2.06 ± 0.07	0.25 ± 0.07	1.74 ± 0.08 <sup>2)</sup>	7.35 ± 0.61 <sup>2)</sup>	13.83 ± 1.13 <sup>2)</sup>

1)  $P < 0.05$  compared with C57BL/6 donor group, 2)  $P < 0.01$  compared with C57BL/6 donor group.

## 2.3 致敏模型接受移植后的生存情况

单纯照射的空白对照组在照射后第10~16天全部死亡(图1),中位存活时间是14d,说明8Gy的预处理方案是致死量照射。接受C57BL/6供者骨髓细胞的移植受者在第12~15天亦全部死亡,中位存活时间是13d,经Log-rank检验此组与照射对照组的生存率差异无统计学意义( $P = 0.071$ ,  $> 0.05$ )。部分濒死动物的足垫出现淤血,检测血象及取骨髓切片检查均证实骨髓衰竭,肝肠等组织病理检查均无明显的炎症细胞浸润表现。接受BALB/c供者骨髓细胞的移植受者在第28天仍能全部存活,经Log-rank检验,此组与C57BL/6供者组的生存率差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

## 2.4 致敏模型移植后的造血重建及骨髓细胞恢复情况

致敏模型接受C57BL/6供者的骨髓细胞后其血象的白细胞、血红蛋白及血小板等均呈进行性下降,出现明显的贫血、出血等征象;而接受BALB/c供者骨髓细胞的致敏模型血象能逐渐恢复,自移植后第14天血象已基本恢复到正常水平。如表3中两组移植受者的白细胞数值所示,经统计分析两组的差异有明显的统计学意义( $P < 0.001$ )。

移植后两组的骨髓细胞变化与外周血细胞改变基本一致,C57BL/6供者组的受者骨髓细胞进行性减少,BALB/c供者组的逐渐增加,两组差异

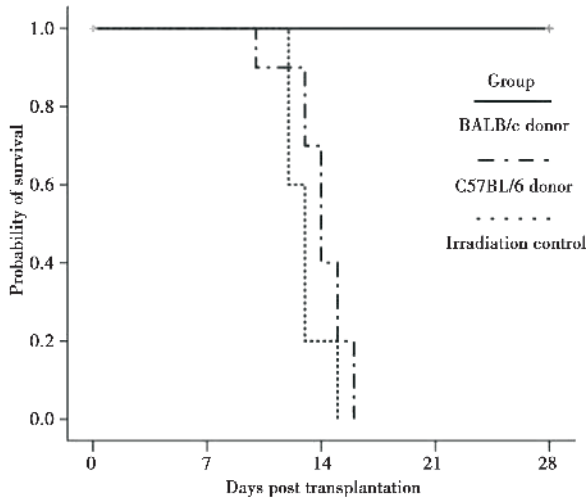


图 1 致敏受者接受不同供者来源骨髓细胞后生存分析。  
Fig.1 Survival analysis of recipients transplanted with different donor cells. ( $n = 10$ )

有明显的统计学意义( $P < 0.001$ )。集落培养同样反映骨髓细胞的恢复情况,分别取移植后第 7 天及 14 天的移植受者骨髓细胞进行培养,结果发现 C57BL/6 供者组并不能培养出 CFU-GM,而 BALB/c 供者组第 14 天的 CFU-GM 已基本恢复正常(表 3)。

表 3 移植受者白细胞及骨髓细胞恢复情况

Table 3 Recovery of white blood cells and bone marrow cells in recipients after transplantation

( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Donor	WBC ( $\times 10^9/L$ )		BMCs ( $\times 10^6/\text{bone}$ )		CFU-GM( $/2 \times 10^4$ NC)	
	7th day	14th day	7th day	14th day	7th day	14th day
C57BL/6	$0.38 \pm 0.08$	$0.28 \pm 0.08$	$0.21 \pm 0.03$	$0.06 \pm 0.02$	0	0
BALB/c	$1.53 \pm 0.25^{1)}$	$6.15 \pm 0.29^{1)}$	$3.50 \pm 0.27^{1)}$	$9.10 \pm 0.45^{1)}$	$60.60 \pm 5.94^{1)}$	$172.80 \pm 7.56^{1)}$

1)  $P < 0.001$  compared with the C57BL/6 donor group.

重要场所之一。

我们进一步比较了全不相合骨髓细胞与全相合骨髓细胞在致敏模型的植入情况,结果显示全不相合的骨髓细胞并不能挽救致死量照射的致敏模型,此组的移植受者血象及骨髓细胞呈进行性下降,以至全部死于骨髓衰竭;而予全相合的骨髓细胞移植组能长期存活,并能迅速恢复血象及骨髓象。此结果明确表明全不相合骨髓细胞不能在致敏模型体内植入,而全相合供者骨髓细胞能致敏模型体内有效植入。

有关全不相合骨髓细胞在致敏模型中被排斥的机制尚未明确,一般认为与受者体内记忆性免

### 3 讨论

本实验应用反复输注同种异基因脾细胞方式建立的致敏模型,此模型已证实体内具有高滴度的供者反应性抗体水平,是研究输血致敏与移植关系的良好模型<sup>[3]</sup>。我们探讨不同供者来源的骨髓细胞在致敏模型的归巢,予胞浆荧光染料 CFSE 标记骨髓细胞,通过病理切片及细胞悬液示踪供者细胞的分布。结果显示骨髓细胞在非造血器官如肝脏及肺脏的分布随时间推移而减少,说明骨髓细胞的停留在非造血组织是暂时性的。全不相合的骨髓细胞在致敏模型股骨中在移植第 12 小时后也有减少的趋势,证实了此细胞在致敏模型的造血组织中逐渐消失以至骨髓衰竭。全相合骨髓细胞在致敏模型股骨中分布随时间推移而增加,说明此细胞能正常归巢及增殖。值得注意的还有供者细胞在致敏模型脾脏的分布,结果显示全不相合供者细胞在脾脏的分布随时间推移而减少,而全相合供者细胞脾脏的分布随时间推移而增加,说明全不相合的骨髓细胞在免疫器官脾脏中被破坏,同时也说明脾脏亦是供者细胞归巢的

疫细胞及预存的抗体有关,其中抗体介导的移植排斥占主要地位<sup>[5]</sup>。抗体可能通过多种机制损伤造血干细胞,如抗体能与异基因骨髓细胞 MHC 分子结合,通过补体依赖或抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用等途径杀伤异基因骨髓细胞<sup>[6]</sup>。有研究表明此抗体的作用具有供者特异性,对无关供者或全相合骨髓细胞无杀伤作用<sup>[7]</sup>。另一方面,有研究认为致敏受者血清可影响造血祖细胞的增殖与分化。临床实验中,国外有学者将再障患者血清与骨髓细胞体外孵育培养,结果发现能明显抑制造血细胞集落的形成<sup>[8]</sup>。最近本课题组检测 15 份重型  $\beta$  地中海贫血患儿血清,发现患儿血清中群

体反应性抗体阳性标本有6例,阳性检出率为40%,抗体强度在14%~75%;进一步,分离脐血CD34<sup>+</sup>细胞作为造血干/祖细胞,通过体外集落培养也发现血清群体反应性抗体能明显抑制各种细胞集落形成<sup>[9]</sup>。

临床治疗高敏患者的措施有应用免疫抑制剂、单克隆抗体、免疫吸附、血浆置换等,已有研究证实联合应用以上措施能促进移植物的植入,降低移植排斥的发生率<sup>[10]</sup>。最近 Xu 等<sup>[11]</sup>在致敏动物模型的移植实验中发现,增加预处理方案的强度,能有效清除致敏免疫细胞,但不能防止致敏受者体内抗体介导的移植排斥。他们研究还发现,应用免疫球蛋白、anti-CD19 及 anti-B220 单抗等均不能提高全不相合骨髓细胞在致敏模型的植入。有研究表明应用骨髓腔注射方法能减少造血干细胞在非造血组织的滞留作用并促进其植入,而最近我们有研究表明此方法并不能促进全不相合供者骨髓细胞在致敏模型的植入<sup>[3]</sup>。

如何促进异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入是目前研究的热点。临床观察表明,应用 HLA 不全相合的造血干细胞治疗重型地中海贫血的植入率仅为 45%;而选用 HLA 全相合同胞供者行造血干细胞进行移植,其植入率达 80%以上<sup>[12]</sup>。我们实验表明也表明全不相合的供者骨髓细胞在致敏模型中完全被排斥,而全相合供者的骨髓细胞能在致敏模型中进行有效的归巢及植入,说明寻找 HLA 全相合供者是造血干细胞移植治疗致敏受者的关键因素。

#### 参考文献:

- [1] Lee PC, Zhu L, Terasaki PI, et al. HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss [J]. *Transplantation*, 2009, 27, 88(4): 568-574.
- [2] Ciurea SO, de Lima M, Cano P, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation [J]. *Transplantation*, 2009, 88(8): 1019-1024.
- [3] 许吕宏, 方建培, 徐宏贵, 等. 致敏模型的建立及其对造血干细胞植入的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(6): 1339-1343.
- [4] Dooner M, Cerny J, Colvin G, et al. Homing and conversion of murine hematopoietic stem cells to lung [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1): 47-51.
- [5] Taylor PA, Ehrhardt MJ, Roforth MM, et al. Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients [J]. *Blood*, 2007, 109(3): 1307-1315.
- [6] 许吕宏, 方建培, 翁文骏, 等. 脾细胞输注致敏对异基因骨髓细胞损伤的机制 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(6): 781-785.
- [7] Colson YL, Schuchert MJ, Ildstad ST. The abrogation of allosensitization following the induction of mixed allogeneic chimerism [J]. *J Immunol*, 2000, 165(2): 637-644.
- [8] Barrett AJ, Faille A, Saal F, et al. Marrow graft rejection and inhibition of growth in culture by serum in aplastic anaemia [J]. *J Clin Pathol*, 1978, 31(12): 1244-1248.
- [9] Fang JP, Xu LH, Yang XG, et al. Panel reactive antibody in thalassemic serum inhibits proliferation and differentiation of cord blood CD34<sup>+</sup> cells in vitro [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26(5): 338-344.
- [10] Vo AA, Peng A, Toyoda M, et al. Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation [J]. *Transplantation*, 2010, 89(9): 1095-1102.
- [11] Xu H, Chilton PM, Tanner MK, et al. Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients [J]. *Blood*, 2006, 108(10): 3611-3619.
- [12] Lucarelli G, Gaziev J. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia [J]. *Blood Rev*, 2008, 22(2): 53-63.

(编辑 张思健)