

## 脾细胞输注致敏对异基因骨髓细胞损伤的机制

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

**摘要:**【目的】探讨脾细胞输注致敏对异基因供者骨髓细胞损伤的作用机制。【方法】应用异基因脾细胞输注的 BALB/c 小鼠作为致敏模型, 未致敏(正常)BALB/c 小鼠作为对照, 异基因供者骨髓细胞来源于 C57BL/6 小鼠。通过补体依赖细胞毒性反应(CDC)、细胞毒性免疫细胞杀伤作用、抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)、粒-单核细胞集落培养(CFU-GM)等实验研究致敏血清及致敏免疫细胞对异基因骨髓细胞的影响。【结果】与补体孵育 30 min 或 1 hr 后, 致敏血清组死亡细胞百分比明显高于正常血清组, 其差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); 细胞毒性免疫细胞杀伤作用及 ADCC 实验中致敏组的细胞毒性指数均高于正常组, 其差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ ); 致敏血清与骨髓细胞孵育组的 CFU-GM 数量比单纯骨髓细胞组有所减少, 但两者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。【结论】致敏受者通过体液免疫及细胞免疫途径损伤异基因骨髓细胞。

**关键词:** 脾细胞; 致敏; 骨髓细胞; 损伤

中图分类号: R457

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)06-0781-05

### Mechanism of Impaired Allogeneic Bone Marrow Cells Caused by Sensitization of Spleen Cells Transfusion

XU Lü-hong, FANG Jian-pei\*, WENG Wen-jun, HONG Dong-ling

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

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the mechanism of impaired allogeneic donor bone marrow cells (BMCs) caused by sensitization of spleen cells transfusions. 【Methods】 BALB/c mice received allogeneic splenocytes transfusions were used as sensitized model, while non-sensitized BALB/c were used as normal controls. Allogeneic BMCs from C57BL/6 were considered as donor cells. The effects of sensitized sera and immunity cells on donor BMCs were evaluated by the following tests: complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), Immune cell cytotoxicity and colony-forming units for granulocyte/monocyte (CFU-GM). 【Results】 The percentages of dead cell in sensitized sera group were much higher than the control group after 30 min or 1 h incubation with complement, and the differences were statistically significant ( $P < 0.001$ ). The cytotoxic indexes of immune cells and ADCC tests were higher in sensitized group comparing with control group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The numbers of CFU-GM in the group of BMCs with sensitized sera were lower than the group of BMCs alone, but no statistically significant differences were found between these two groups ( $P > 0.05$ ). 【Conclusion】 Sensitization is cable of impairing allogeneic BMCs through humoral and cellular immunity pathways.

**Key word:** spleen cells; sensitization; bone marrow cells; impair

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 781-785]

本课题组通过脾细胞输注途径可建立致敏动物模型, 检测致敏动物血清发现含有高滴度的供者反应性抗体。进一步, 在该致敏模型进行异基因骨髓移植, 结果发现致敏模型完全排斥供者骨髓

细胞, 说明脾细胞输注致敏能损伤异基因供者骨髓细胞<sup>[1]</sup>。但有关致敏引起造血干细胞移植排斥的作用机制尚未明确。本研究拟通过分析致敏血清及致敏免疫细胞对供者骨髓细胞的影响, 以阐明致敏损

收稿日期: 2010-06-17

基金项目: 广东省医学科研基金(B2010086); 广东省自然科学基金(7001586); 国家自然科学基金(30872383)

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

伤异基因骨髓细胞的作用机制,并为促进异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入提供理论依据。

## 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-2Db)及 BALB/c(H-2Dd),均为雄性,6~8周,体质量 18~20 g,由中山大学实验动物中心提供。兔补体及溴化乙锭/吖啶橙(EB/AO)均为 One Lambda 公司产品,羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)为 Invitrogen 公司产品,PE-PI 购自 Bender 公司,甲基纤维素半固体培养基(MethocultTMGMF 3434)购自 Stem Cell 公司。

### 1.2 致敏模型与异基因骨髓细胞

以 C57BL/6 脾细胞作为刺激源,BALB/c 作为致敏受者。应用红细胞裂解法分离 C57BL/6 脾细胞,经台盼兰染色检测细胞的活力(>99%)。每周经尾静脉输注  $1 \times 10^6$  C57BL/6 脾细胞到 BALB/c,共 2 次,以脾细胞输注结束后第 7 天的 BALB/c 作为致敏模型,而未致敏(即未予脾细胞输注)的 BALB/c 作为正常对照。同时以分离 C57BL/6 骨髓细胞,先冲洗 C57BL/6 股骨内的细胞,经 ficoll 法分离得骨髓细胞,经台盼兰染色检测细胞的活力(>99%)。

### 1.3 补体依赖细胞毒性反应

应用补体依赖细胞毒性反应(complement-dependent cytotoxicity,CDC)方法检测致敏抗体对供者骨髓细胞的杀伤作用。分离正常小鼠及致敏模型的血清,并将 C57BL/6 骨髓细胞的浓度调为  $2 \times 10^7/\text{mL}$ 。分别取 10  $\mu\text{L}$  血清与骨髓细胞混合于 96 孔培养板,37  $^{\circ}\text{C}$ ,孵育 30 min,然后加入 10  $\mu\text{L}$  兔补体并孵育不同时间(20 min,30 min,1 h),再加荧光染料 EB/AO 孵育 2 min。绿色荧光代表活细胞,而红色荧光代表死亡细胞,计算死亡细胞百分比。

### 1.4 致敏免疫细胞对异基因骨髓细胞的损伤作用

1.4.1 细胞毒性免疫细胞的杀伤作用 参照文献[2]的方法将 C57BL/6 骨髓细胞予荧光染料 CFSE 标记,同时分离正常 BALB/c 及致敏模型的脾细胞。进行细胞毒性免疫细胞的杀伤作用实验时,分别取  $1 \times 10^6$ (0.1 mL)C57BL/6 骨髓细胞与  $1 \times 10^6$ (0.1 mL)正常 BALB/c 或致敏模型的脾细胞混合,于 37  $^{\circ}\text{C}$  共孵育 24 h。再加入荧光标记 PE-PI,检测

骨髓细胞的死亡百分比。根据以下公式计算细胞毒性指数 CI:  $[(\text{混合组骨髓细胞死亡百分比}-\text{单独骨髓细胞组死亡百分比})/(\text{100\%}-\text{单独骨髓细胞组死亡百分比})] \times 100 = \text{CI}$ 。

1.4.2 抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 进行抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)实验时,取  $1 \times 10^6$ (0.1 mL)CFSE 标记的 C57BL/6 骨髓细胞与 50  $\mu\text{L}$  正常 BALB/c 或致敏模型的血清混合,再加入  $1 \times 10^6$ (0.1 mL)正常 BALB/c 或致敏模型的脾细胞作为效应细胞,于 37  $^{\circ}\text{C}$  共孵育 24 h。同样再加入荧光标记 PE-PI,检测骨髓细胞的死亡百分比,并按 1.4.1 的公式计算细胞毒性指数 CI。

### 1.5 粒-单核细胞集落培养(CFU-GM)

C57BL/6 骨髓细胞与正常 BALB/c 血清或致敏模型血清于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min,然后加入终浓度为 10% 的兔补体,再孵育 30 min,用 PRMI-1640 培养液洗涤 3 遍后重悬细胞。取  $2 \times 10^4$ (0.1 mL)骨髓细胞置于 1 mL 甲基纤维素半固体培养体系进行集落培养,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  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。

### 1.6 统计分析

本实验计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件包处理,各实验组间比较用随机区组方差分析及 Student-Newman-Keals 两两组间比较,检验水准设  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 致敏抗体对异基因骨髓细胞的损伤作用

致敏模型血清中含有针对供者细胞的抗体,应用 CDC 方法可检测致敏抗体对供者骨髓细胞的影响。表 1 的结果显示,在与补体孵育 30 min 或 1 hr 后,致敏血清组死亡细胞百分比(Group D)明显高于正常血清组(Group C),其差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明致敏抗体能通过 CDC 途径杀伤供者骨髓细胞。骨髓细胞与补体孵育的结果(Group B)显示,死亡细胞所占的比例随时间延长而增加,说明补体能非特异杀伤骨髓细胞。而在无补体存在条件下,A 组与 E 组的实验结果差异无统计学意义( $P < 0.05$ ),说明此反应依赖于补体。

表1 CDC 实验结果

Table 1 Intensity of reaction in CDC tests

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

Group	Compositions	% Death Cells*		
		20 min	30 min	1 h
A	Bone marrow cells (BMCs)	0.40 ± 0.10	0.46 ± 0.14	0.46 ± 0.12
B	BMCs + complement	5.00 ± 1.01	8.00 ± 1.86 <sup>1)</sup>	27.59 ± 2.52
C	BMCs + non-sensitized sera + complement	5.00 ± 0.72	7.80 ± 1.93 <sup>1)</sup>	28.20 ± 2.06
D	BMCs + sensitized sera + complement	5.80 ± 1.29	50.80 ± 3.12 <sup>2)</sup>	80.00 ± 2.37 <sup>2)</sup>
E	BMCs + sensitized sera	0.35 ± 0.09	0.53 ± 0.13	0.44 ± 0.12

1)  $P < 0.05$  compared with 20 min of the same group, 2)  $P < 0.001$  compared with other groups. CDC, complement-dependent cytotoxicity

## 2.2 致敏免疫细胞对异基因骨髓细胞的损伤作用

2.2.1 细胞毒性免疫细胞杀伤作用 同时予 CFSE 及 PE-PI 荧光标记检测死亡骨髓细胞所占的百分比。如表 2 所示,致敏免疫细胞与异基因骨髓细胞孵育组(Group B)细胞毒性指数明显高于正常对照组(Group A),两者的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明致敏免疫细胞能通过细胞

毒性免疫细胞杀伤作用的途径损伤异基因骨髓细胞。

2.2.2 ADCC 作用 表 2 中致敏实验组(Group D)的细胞毒性指数亦明显高于正常对照组(Group C),两者差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明致敏抗体与免疫细胞能通过 ADCC 途径杀伤异基因骨髓细胞。

表2 细胞毒性免疫细胞杀伤作用和 ADCC 的实验结果

Table 2 Cytotoxic index of CTL and ADCC tests

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

Group	Test	Compositions	Cytotoxic index
A	CTL	BMCs + non-sensitized splenocytes	26.24 ± 3.03
B	CTL	BMCs + sensitized splenocytes	44.26 ± 3.64 <sup>1)</sup>
C	ADCC	BMCs + non-sensitized sera + non-sensitized splenocytes	1.58 ± 0.28
D	ADCC	BMCs + sensitized sera + sensitized splenocytes	14.45 ± 2.16 <sup>2)</sup>

1)  $P < 0.05$  compared with group A, 2)  $P < 0.001$  compared with group C. CTL, cytotoxic T lymphocytes; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity

## 2.3 致敏血清对异基因骨髓细胞体外增殖分化的影响

集落培养能反映造血祖细胞在体外增殖分化情况。如表 3 所示,在补体存在条件下,致敏血清组(Group D)的 CFU-GM 的数量与正常血清组(Group C)及单独补体组(Group B)的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而 B、C、D 三组的 CFU-GM 均明显低于单纯骨髓细胞培养组(Group A),其差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明补体能减少集落的生成。与 A 组相比,致敏血清与骨髓细胞孵育组(Group E)的 CFU-GM 数量有所减少,但两者差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明致敏血清并不能抑制造血祖细胞的体外增殖与分化。

表3 CFU-GM 集落培养

Table 3 Colonies of CFU-GM

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

Group	Compositions	CFU-GM
A	Bone marrow cells (BMCs)	179.25 ± 7.14
B	BMCs + complement	126.25 ± 4.76 <sup>1)</sup>
C	BMCs + non-sensitized sera + complement	128.00 ± 5.48 <sup>1)</sup>
D	BMCs + sensitized sera + complement	121.25 ± 4.99 <sup>1)</sup>
E	BMCs + sensitized sera	175.25 ± 4.11

1)  $P < 0.001$  compared with group A. CFU-GM, colony-forming units for granulocyte/monocyte

临床研究发现,移植前接受多次输血的患者发生移植排斥风险明显增加,但有关输血致敏与移植排斥的机制尚未明确。对实体器官移植而言,移植物的血管内皮系统是受攻击的首要靶点,内皮细胞损伤后可继发引起系列病理反应,包括血小板活化、血栓形成、内皮细胞及血管平滑肌细胞

## 3 讨论

### 3.1 致敏与移植排斥

增殖等,造成血管阻塞而引起不可逆的缺血损伤<sup>[3-4]</sup>。造血干细胞移植与实体器官移植有所不同,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。

本实验研究表明,致敏受者损伤异基因骨髓细胞的机制主要通过免疫杀伤作用途径。异基因脾细胞输注能使受者体内产生高水平的供者反应性抗体以及大量的免疫记忆细胞,当再次接受异基因骨髓细胞移植时,致敏受者能迅速启动体液免疫及细胞免疫而损伤靶细胞。本实验证实致敏受者体内抗体能与异基因骨髓细胞表面分子 MHC 结合,通过 CDC 及 ADCC 途径杀伤靶细胞;致敏 CTL 细胞亦能清除异基因靶细胞。

### 3.2 作用机制以及临床指导意义

由于移植前应用免疫抑制剂或照射预处理能清除体内大部分免疫细胞,但对已存的抗体水平无影响,由抗体介导体液免疫在移植排斥中更为重要的作用。国外有学者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及增加异基因骨髓细胞的数量,能克服致敏免疫细胞介导的移植排斥,但不能克服致敏受者预存抗体介导的移植排斥,说明抗体介导的移植排斥占主要地位<sup>[5]</sup>。还有研究应用免疫球蛋白 FcR-/- 的动物作为致敏受者,发现此致敏模型不能完全排斥异基因骨髓细胞的植入,说明抗体介导的移植排斥亦有赖于受者 FcR<sup>+</sup>细胞的存在,也证实了抗体通过 ADCC 途径损伤异基因骨髓细胞<sup>[6]</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,Barrett 等<sup>[7]</sup>将再生障碍性贫血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。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>[8]</sup>。此外,还有研究认为输血致敏受者体内抗体多为 IgG 类型,与造血干细胞抗原结合后可通过桥联作用激活细胞内 Fas 途径,从而引起造血干细胞凋亡<sup>[9]</sup>。然而本课题组的动物实验结果表明致敏血清并不能抑制造血祖细胞的体外增殖与分化,与临床实验结果不一致,可

能与细胞集落培养的体系不同有关。

如何促进异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入是目前临床亟待解决的问题。已有研究表明骨髓腔注射方法能减少异基因骨髓细胞在移植受者非造血组织的滞留作用,促进异基因骨髓细胞在移植受者体内的归巢与植入<sup>[10]</sup>。然而在临床研究发现通过骨髓腔注射方法并不能有效促进异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入,作用机制可能与异基因骨髓细胞在致敏受者骨髓微环境被免疫损伤有关。最近国外有学者应用抗 CD20 单抗及血浆置换等方法干预处理 4 例致敏受者,发现其中有 2 例患者的血清抗体强度明显下降,并成功获得异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入;然而另 2 例患者血清抗体仍保存在高滴度水平,移植后均出现造血干细胞移植排斥<sup>[11]</sup>。我们实验结果表明致敏受者通过体液免疫及细胞免疫途径杀伤异基因骨髓细胞,抑制致敏受者的免疫反应是促进移植成功的关键。现有研究表明骨髓间充质细胞能抑制 T 细胞及 B 细胞免疫反应,并促进移植受者免疫造血重建<sup>[12]</sup>,提示应用骨髓间充质细胞有望成为促进异基因骨髓细胞在致敏受者体内植入的新策略。

### 3.3 小结

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。本实验结果表明致敏受者通过体液免疫及细胞免疫途径杀伤异基因骨髓细胞,降低致敏受者体内抗体水平及阻断免疫应答途径是移植成功的关键。临床已有研究应用丙种球蛋白、anti-CD20 单抗等成功促进异基因移植体在致敏受者体内植入,并明显降低移植排斥发生率,进一步探讨致敏移植新策略将是未来的研究方向<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Xu LH, Fang JP, Huang WG, et al. Marrow graft rejection by repeated transfusions of allogeneic donor spleen cells [J]. Bone marrow transplantation, 2007, 40(7): 691-698.
- [3] Everly MJ, Rebellato LM, Ozawa M, et al. Beyond histology: lowering human leukocyte antigen antibody to improve renal allograft survival in acute rejection [J]. Transplantation, 2010, 89(8): 962-967.

- [4] 袁小鹏,王长希,何晓顺,等. 虚拟交叉配型在高致敏肾移植受者中的应用[J]. 中山大学学报:医学科学版,2009,30(4):196-198.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Fang JP, Xu LH, Yang XG, et al. Panel reactive antibody in thalassemic serum inhibits proliferation and differentiation of cord blood CD34+ cells in vitro [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26(5): 338-344.
- [9] Liu H, Mihara K, Kimura A, et al. Induction of apoptosis in CD34+ cells by sera from patients with aplastic anemia [J]. *Hiroshima J Med Sci*, 1999, 48(2): 57-63.
- [10] 蔡耘,黄绍良,陈凤英,等. 同种异基因小鼠骨髓腔内脐血移植模型的建立及其对造血干细胞植入的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版,2005,26(6):644-650.
- [11] 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.
- [12] 黄绍良,周敦华,方建培,等. 间充质干细胞与脐血联合移植的I期临床观察[J]. 中山大学学报:医学科学版,2003,24(3):306-307.
- [13] 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.

(编辑 张恩健)

(上接第780页 from page 780)

- effect of oxycoumarins isolated from the Thai medicinal plant *Clausena guillauminii* on the inflammation mediators, iNOS, TNF-alpha, and COX-2 expression in mouse macrophage RAW 264.7 [J]. *J Nat Med*, 2009, 63(1): 21-27.
- [7] 刘先国. 外周神经损伤引起病理性疼痛的机制 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2009,30(6):641-644.
- [8] Chen YJ, Huang CW, Lin CS, et al. Expression and function of proton-sensing G-protein-coupled receptors in inflammatory pain [J]. *Mol Pain*, 2009, 5: 39.
- [9] Rocha-González HI, Herrejon-Abreu EB, López-Santillán FJ, et al. Acid increases inflammatory pain in rats: Effect of local peripheral ASICs inhibitors [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1-3): 56-61.
- [10] 张劲军,肖颖,钟觉明. 髓核源性坐骨神经痛大鼠背根神经节磷酸化 p38MAPK 表达的变化 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2009,30(6):652-656.
- [11] Kang JD, Stefanovic-Racic M, McIntyre LA, et al. Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation [J]. *Spine*, 1997, 22(10): 1065-1073.
- [12] Eshcol JO, Harding AM, Hattori T, et al. Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) cell surface expression is modulated by PSD-95 within lipid rafts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(3): C732-739.
- [13] Uchiyama Y, Guttapalli A, Gajghate S, et al. Smad3 functions as a transcriptional repressor of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(10): 1619-1628.

(编辑 徐杰)